UEBER DIE POLYKONDENSATION DES THYMIDIN-3'-PHOSPHATS NACH DER TRIESTERMETHODE

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Werner Falk

aus Ortenberg / Deutschland

Basel 1971

UEBER DIE POLYKONDENSATION DES THYMIDIN-3'-PHOSPHATS NACH DER TRIESTERMETHODE

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Werner Falk

aus Ortenberg / Deutschland

Basel 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Paul Jllg, Offsetdruckerei, 7000 Stuttgart, Rötestr. 6

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboratorien des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ch. Tamm ausgeführt.

Herrn Professor Tamm danke ich herzlich für das grosse Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte und für seine stete Hilfsbereitschaft.

Meinen Kollegen bin ich für das angenehme Arbeitsklima zu Dank verpflichtet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0042

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren Dr. Ch. Tamm
Dr. C.A. Grob

Basel, den 5. November 1971

Prof. Dr. H. P. Laubscher
Dekan

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Theoretischer Teil	
I.	Einleitung	1
II.	Problemstellung	2
III.	Eigene Untersuchungen	10
	1. Die Voraussetzungen für die Polykondensation von Thymdin-3'-β-cyanoäthylphosphat	10
	2. Die Herstellung der Ausgangssubstanzen	16
	2.1. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin	16
	2.2. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat	17
	2.3. Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat	23
	2.4. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-(bis-β-cyanoäthyl)-phosphat	26
	3. Die Herstellung der Vergleichssubstanzen	27
	3.1. 5'-O-Monomethoxytritylthymidylyl-thymidin	27
	3.2. 3'-O-Acetylthymidin-5'-phosphat	28
	3.3. Die Thymidinoligonukleotide 5, 6 und 7	29
	4. Die Phosphorylierungsreaktionen	33
	4.1. Allgemeines	33
	4.2. Die Phosphorylierung des Thymidindinukleotides 4	34
	4.3. Die Phosphorylierung des Thymidintrinukleotides 5	35
	4.4. Die Phosphorylierung des Thymidintetranukleotides 6	37
	4.5. Die Phosphorylierung des Thymidinpentanukleotides 7	39
	5. Die Polykondensation von Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat	39
	6. Diskussion des Ergebnisses	45

		Seite
B.	Experimenteller Teil	48
I.	Allgemeines	48
II.	Beschreibung der Versuche	49
	1. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin	49
	2. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat	50
	2.1. Herstellung mit Dicyclohexylcarbodiimid	51
	2.2. Herstellung mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid	51
	2.3. Isolierung als Cyclohexylammoniumsalz	52
	2.4. Isolierung als Bariumsalz	53
	3. Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat	53
	4. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-(bis-β-cyanoäthyl)-phosphat	55
	5. 5'-O-Monomethoxytritylthymidylylthymidin	55
	6. 3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphat	56
	7. Das 5'-O-Monomethoxytritylthymidintrinukleotid 5	56
	8. Das 5'-O-Monomethoxytritylthymidintetranukleotid 6	58
	9. Das 5'-O-Monomethoxytritylthymidinpentanukleotid 7	59
	10. Die Phosphorylierungen	60
	11. Die Polykondensation von Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat	64
III.	Die enzymatischen Spaltungen	68
	1. Spaltungen mit Kälberdarm-Phosphomonoesterase	68
	2. Spaltungen mit Schlangengift-Phosphodiesterase	69
	3. Spaltungen mit Milz-Phosphodiesterase	70
IV.	Rf-Tabelle	71
C.	Zusammenfassung	72
D.	Literaturverzeichnis	75
E.	Curriculum vitae	78

A. Theoretischer Teil

I. Einleitung

Die Funktion der Desoxyribonukleinsäuren (DNA) als Träger der genetischen Information ist bereits lange bekannt. Ueber die Aufgaben der Ribonukleinsäuren (RNA) kann man erst seit wenigen Jahren Genaueres aussagen [1]. Die funktionellen Zusammenhänge zwischen den Nukleinsäuren und der Biosynthese der Proteine beginnen sich langsam abzuzeichnen.

Mit Hilfe von synthetischen Oligo- und Polynukleotiden sollten sich die Kopier- und Uebersetzungsvorgänge bei der Biosynthese der Proteine besonders gut untersuchen lassen [2]. Für das genaue Studium von Basenpaarung und Stabilität der Doppelhelices sind synthetische Oligonukleotide von Bedeutung [3]. Um die Leserichtung des genetischen Codes bestimmen zu können, sind Polynukleotide mit definierten terminalen Tripletts notwendig [4, 5]. Zur Erforschung des genetischen Codes sind die entsprechenden Trinukleotide erforderlich und müssen synthetisiert werden [6, 7, 8]. Die Wirkungsweise und die Mechanismen von Enzymen lassen sich sehr gut an Dinukleosidphosphaten [9] und Oligonukleotiden [10, 11] studieren. Oligonukleotide könnten für die Untersuchung chemischer Mutationen an transformierender DNA als Modelle dienen [12]. Die Sekundärstruktur der DNA lässt sich an Strängen bekannter Nukleotid-Sequenz sicherlich leichter untersuchen. Auch die Sequenzanalyse könnte durch die Synthese von Teilstücken eine wirksame Ergänzung erfahren.

Die chemische Synthese von grösseren Teilstücken hat bisher keine besonderen Erfolge zu verzeichnen. Sie wurde sogar von Khorana in ihrer Bedeutung in Frage gestellt, nachdem es

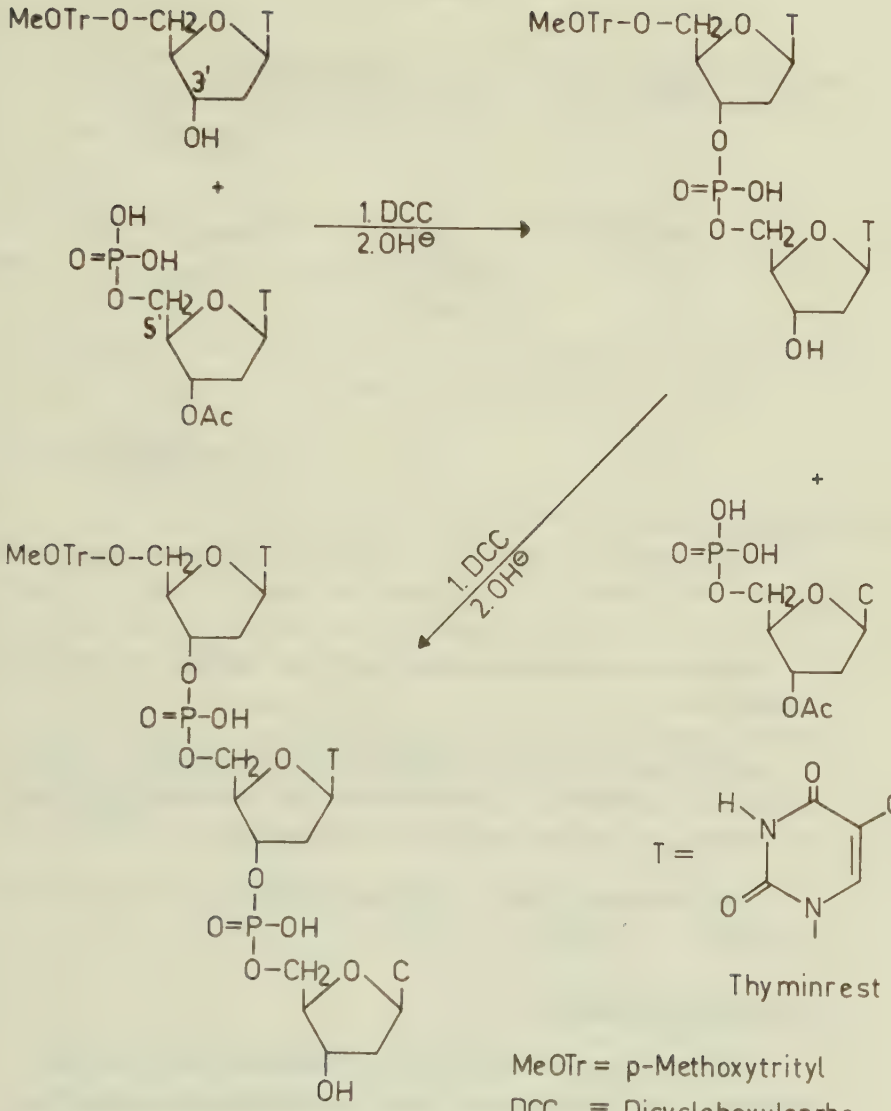
ihm gelungen war, kurze, synthetisch hergestellte Teilstücke mit Hilfe eines Enzyms zur Matrize einer t-RNA zusammenzufügen [13].

II. Problemstellung

Seit 1959 wurden viele verschiedene Wege zur Herstellung von Polynukleotiden beschritten. Die angewandten Arbeitsmethoden lassen sich in mehrere grosse Kategorien zusammenfassen. Innerhalb der einzelnen Kategorien unterscheiden sich die Arbeitsweisen nur noch in der Wahl der Schutzgruppen für die Basen, alkoholischen Hydroxygruppen und Phosphorsäureestergruppierungen. Im folgenden sollen aber nur die Methoden erwähnt werden, die für die Desoxyribosereihe von Wichtigkeit sind. Die Anwesenheit der 2'-Hydroxygruppe in der Ribosereihe gibt Anlass zu Komplikationen und Nebenreaktionen. Es sind inzwischen aber geeignete Schutzgruppen bekannt geworden, die eine Synthese von 3'→5'-gekoppelten Polyribonukleotiden ermöglichen und zulassen, dass die gleichen Kondensationsmethoden wie in der 2'-Desoxyreihe angewendet werden können.

Die schrittweise Kondensation

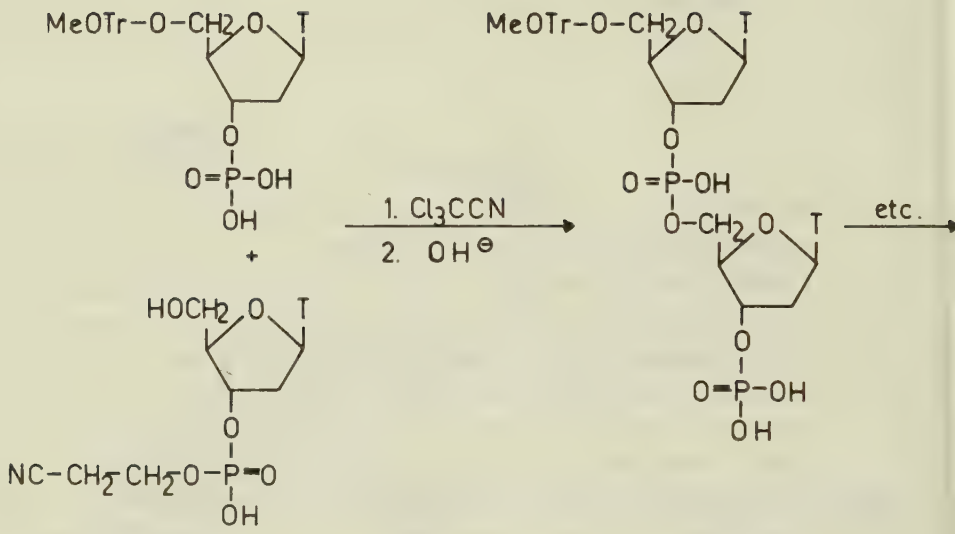
Dieser Reaktionstyp lässt sich in zwei Untergruppen unterteilen. In der ersten Gruppe reagieren ein entsprechend geschütztes Nukleosid mit freiem 3'-Hydroxyl und ein Nukleosid-5'-phosphat zu einem Dinukleosidmonophosphat und entsprechend weiter zu höheren Nukleotiden. Khorana stellte auf diese Weise Dodekanukleotide mit sich wiederholender Triplettfolge her [14, 15]. Das Reaktionsschema gestaltete sich wie folgt:



MeOTr = p-Methoxytrityl

DCC = Dicyclohexylcarbodiimid

Cramer et al. [16] gingen umgekehrt vor. Sie kondensierten ein entsprechend geschütztes 3'-Nukleosidphosphat mit einem Nukleosidphosphat mit freiem 5'-Hydroxyl und erhielten so Polynukleotide mit einer endständigen 3'-Phosphorsäuregruppierung:



Eine ähnliche Methode wurde auch von Khorana et al. [17] untersucht.

Die erste Methode hat gegenüber der zweiten den Nachteil, dass die entstehenden Polynukleotide noch phosphoryliert werden müssen, um eine endständige Phosphatgruppe zu erhalten.

Ganz ähnliche Arbeitsverfahren werden bei der sog. Blockkondensation verwendet.

Die Blockkondensation

Ein typisches Beispiel ist von Kössel et al. [18] beschrieben. Zwei geschützte, durch schrittweise Synthese hergestellte Tetranukleotide, eines mit freier 3'-Hydroxylgruppe und eines mit 5'-endständigem Phosphat, wurden in Pyridin zu einem Octanukleotid kondensiert. Dieses Octanukleotid konnte dann als Ausgangspunkt zur weiteren schrittweisen Synthese dienen.

Hachmann und Khorana [19] verwendeten auch Blöcke verschiedener Grösse zur Kondensation. Sie untersuchten die Reaktionsbedingungen sehr eingehend.

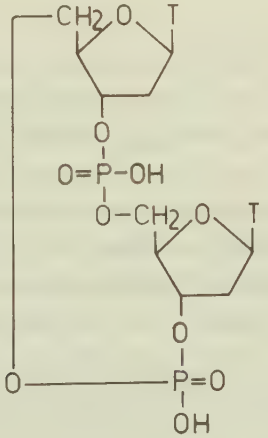
$$d(MeOTr[Tp]_5T) + d(pT)_n ac \xrightarrow[2.\ OH^-]{1.\ DCC} d(MeOTr[Tp]_nT) \qquad 1)$$

$n = 2\text{-}5$ $\qquad\qquad$ $n = 7\text{-}11$

Die Ausbeuten schwankten je nach der Grösse von n zwischen 78 und 50 %, bezogen auf das Hexanukleotid.

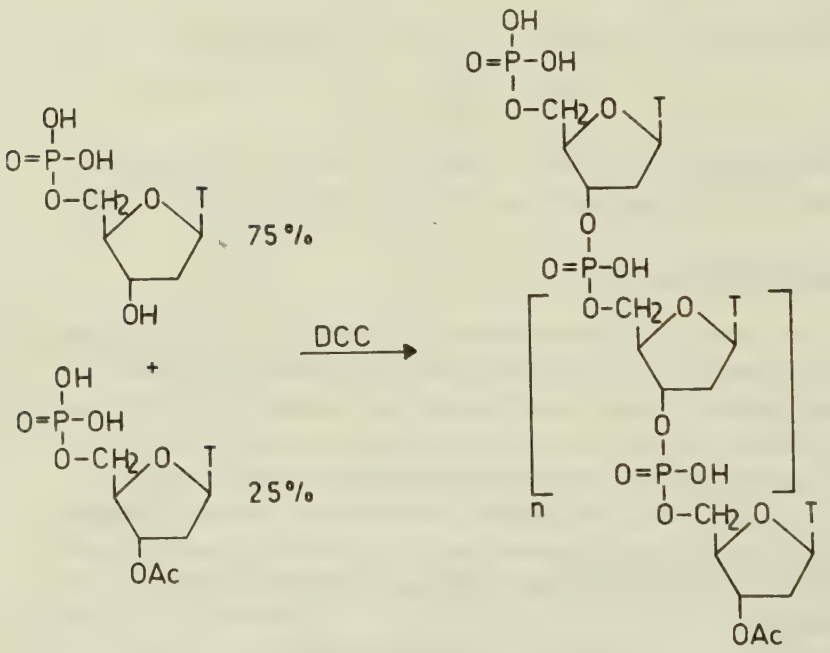
Die Polykondensation

Mit Hilfe der Polykondensation konnten schon früh höhere Oligonukleotide in allerdings schlechten Ausbeuten hergestellt werden. Khorana und Mitarbeiter kondensierten Thymidin-3'-phosphat (T_dp) [20] und Thymidin-5'-phosphat (pT_d) [21] mit sich selbst und erhielten unter anderem eine homologe Reihe linearer Oligonukleotide. Als grösste Einheit konnten sie ein Nonanukleotid nachweisen. Die Ausbeuten lagen zwischen 6 und 3 %. Als Hauptprodukt entstand jeweils das cyclische Dinukleotid:



1) Nomenklatur nach IUPAC-IUB-Empfehlungen
Biochemistry 9, 4022 (1970)

Bessere Ausbeuten an linearen Oligonukleotiden konnten sie erreichen, als sie zur Reaktion 25 % eines geschützten Nukleotides als Kettenstarter zusetzten [22].



Tatsächlich war die Bildung der cyclischen Oligonukleotide schwächer. Unter den Kondensationsprodukten konnte das lineare Dodekanukleotid identifiziert werden. Ausbeuten schwankten zwischen 10 und 1,5 %. Cramer et al. [23] kondensierten Thymidin-3'-phosphat mit einem Enolphosphat als Kondensationsmittel und erhielten ganz ähnliche Ergebnisse wie Khorana. Durch die Polykondensation verschiedener Mononukleotide konnten auch gemischte Polynukleotide hergestellt werden [24, 25, 26].

Durch das Verfahren der Polykondensation wurde bisher bei der Kondensation von Thymidin-5'-phosphat mit Pikrylchlorid die grösste Kettenlänge von 30 Einheiten erreicht [27].

Die Blockpolykondensation

Die gleichen Arbeitsweisen wie oben beschrieben, können auch auf Blöcke bestehend aus zwei oder drei Nukleotiden angewendet werden. Khorana et al. [28] kondensierten anfangs Dinukleotide nach dem Schema:

$$n\ d(pXpY) \longrightarrow d(pXpY)_n$$

Sie erhielten Polynukleotide mit alternierender Dinukleotidsequenz.

Die gleiche Arbeitsgruppe kondensierte dann auch Trinukleotide [29], z. B.:

d (pbzApbzApanC) + d(pbzApbzApanCac)

und erhielten nach Hydrolyse als längstes Glied:

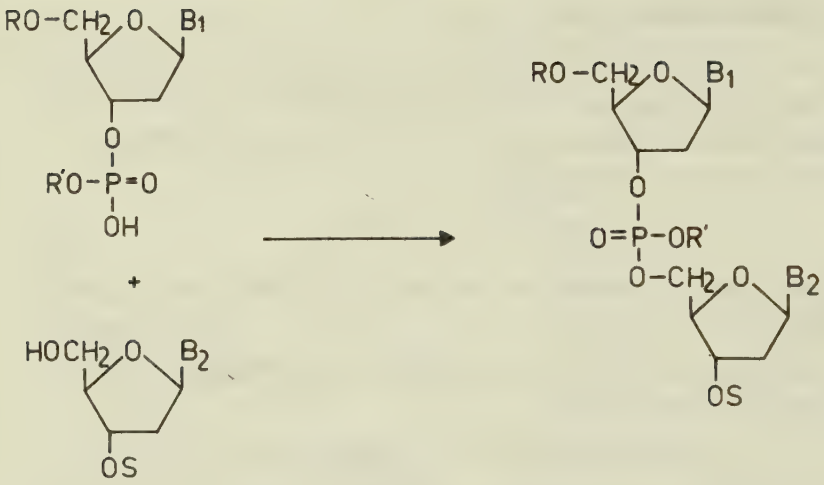
$$d(pA[pApCpA]_5pApC)$$

Cramer et al. [30] benutzten eine ähnliche Methode.

Oligo- und Polynukleotide können auch an löslichen und unlöslichen polymeren Trägern synthetisiert werden (vgl. die kurze Uebersicht bei Séquin [31]).

Die Triestermethoden

In neuerer Zeit versuchte man, die Nachteile der Methode der Kondensation von Monoestern zu Diestern zu überwinden, indem man als Ausgangsmaterialien Diester einsetzte und zu Triestern kondensierte, die dann bei der Aufarbeitung und Trennung als normale ungeladene organische Moleküle behandelt werden können. Dieses Vorgehen war möglich geworden, nachdem es gelungen war, mit Mesitylensulfonylchlorid (MS) und Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) [32] Kondensationsmittel in die Hand zu bekommen, die Phosphorsäurediester genügend zu aktivieren vermochten. Das Reaktionsschema sieht folgendermassen aus:



B_1, B_2 : Basen

S : Nach jedem Reaktionsschritt abzuspaltende Schutzgruppe

R,R' : Am Ende der Polynukleotidsynthese abzuspaltende Schutzgruppe.

Letsinger et al. [33, 34, 35, 40] begannen 1965 die Vor- und Nachteile der Phosphotriestersynthese zu untersuchen. Sie arbeiteten vornehmlich an festen polymeren Trägern, aber auch in Lösung [36]. Als Phosphorsäureschutzgruppe verwendeten sie den β-Cyanoäthylrest. Es wurde immer ein Nukleosid-3'-phosphat mit der 5'-Hydroxylgruppe eines ungeschützten Desoxyribonukleosides verestert. Die unerwünschte Reaktion mit der 3'-Hydroxylgruppe betrug nach enzymatischer Bestimmung nur 4 % [36] der Produkte. Die Reinigung der geschützten Polynukleotide erfolgte an Kieselgel mit Essigester-Tetrahydrofuran-Gemischen als Fliessmittel.

Eckstein et al. [37, 38, 39] arbeiteten nach der gleichen Methode, verwendeten aber den Trichloräthanolrest als Phosphorsäureschutzgruppe.

Auch die Blockkondensation mit Triestern wurde in jüngster Zeit mit hervorragenden Ergebnissen durchgeführt [41]. In der Ribosereihe wurden ebenfalls Versuche unternommen, um mit Phosphorsäuretriestern zu arbeiten [42, 43, 44].

Aus den publizierten Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen über die Vor- und Nachteile der Triestermethode gegenüber der Diestermethode ziehen.

1. Die Produkte der Triestersynthese verhalten sich wie neutrale organische Verbindungen. Sie können an Kieselgel chromatografiert werden.
2. Internuklectidische Bindungen können nicht mehr aktiviert werden. Die Bildung von verzweigten Nukleotiden und Pyrophosphaten sollte unterbleiben.
3. Das Abfallen der Ausbeuten bei zunehmender Kettenlänge sollte dadurch geringer werden.
4. Die Reaktion von Oligonukleotid-3'-Phosphaten mit Phosphorsäureschutzgruppe erfolgt spezifisch mit der primären Hydroxylgruppe von Nukleosiden. Die Reaktionsgemische sollten weniger komplex werden.

Als Nachteil ist bisher nur die längere Reaktionszeit bekannt.

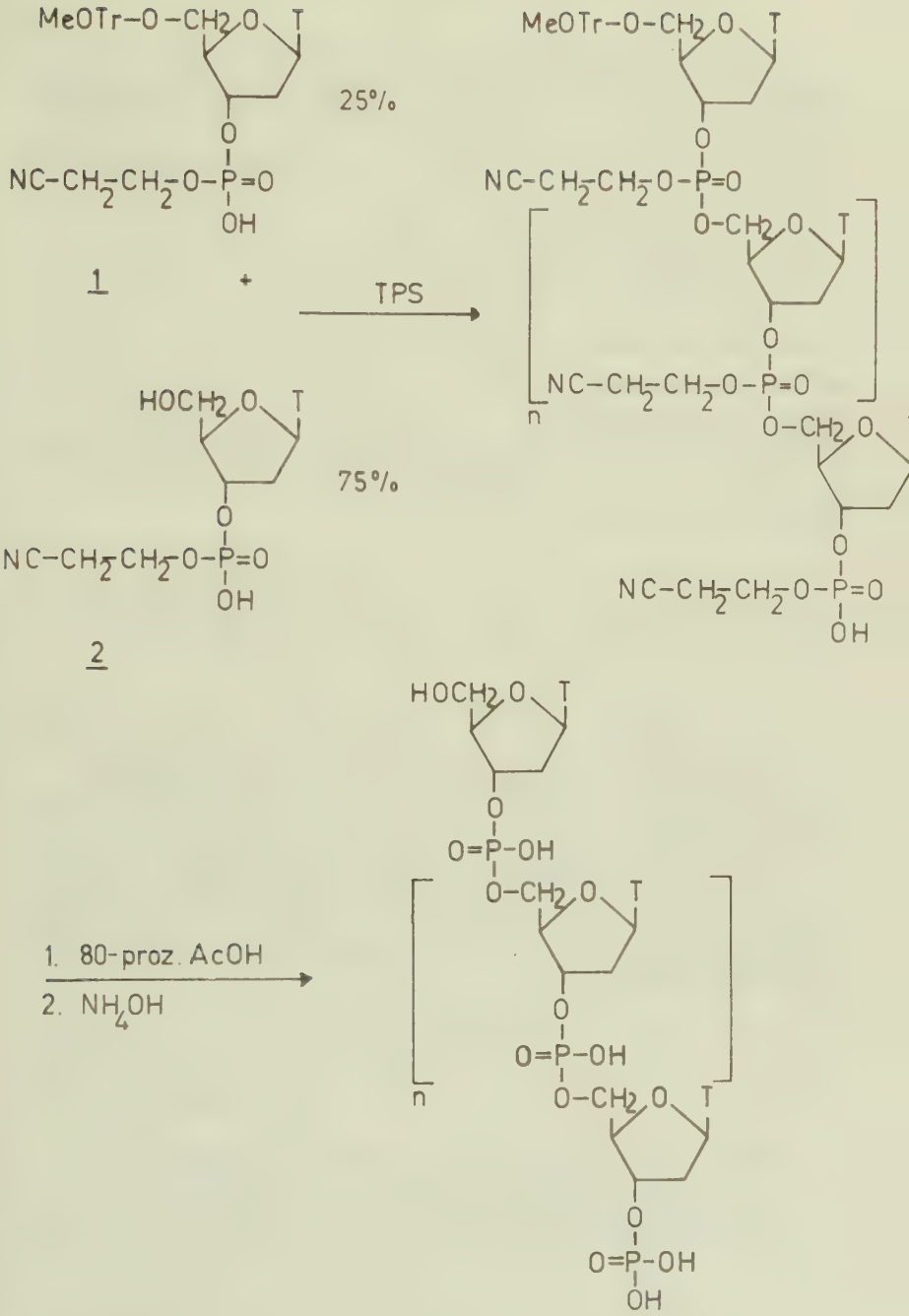
Aus diesen Gründen schien es uns angezeigt, die bisher nicht bekannte Polykondensation zu Triestern zu untersuchen, denn bisher wurden nur schrittweise Synthesen und die Blockkondensation an Polymeren und in Lösung bearbeitet. Ausserdem schien uns diese Kondensation die Möglichkeit zu eröffnen, die genannten Vorteile und die Auswirkungen der längeren Reaktions-

zeiten bei den Triestern genauer kennen zu lernen.

III. Eigene Untersuchungen

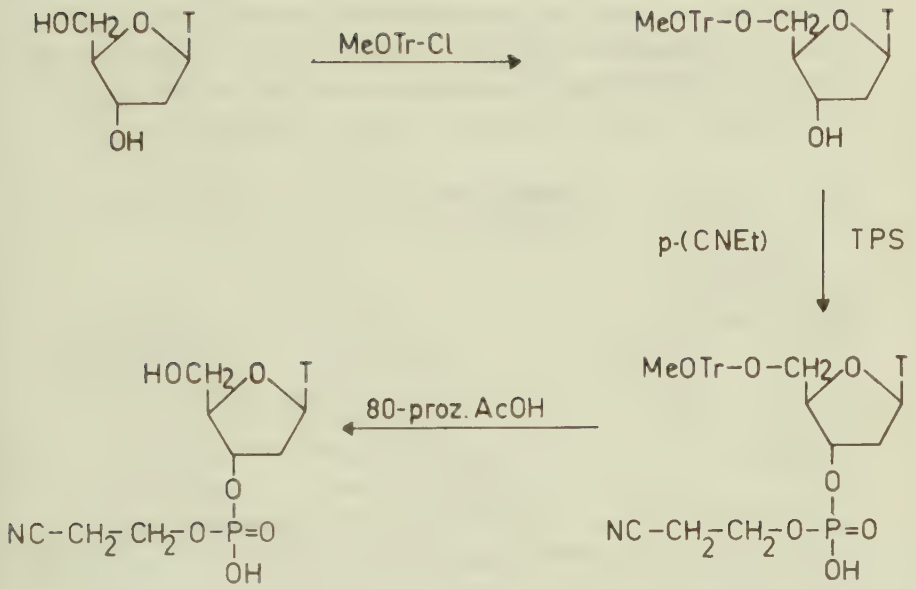
1. Die Voraussetzungen für die Polykondensation von Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat [T_dp-(CNEt)]

In erster Linie interessierte uns der Vergleich der beabsichtigten Polykondensation zu Triestern mit der bisher erfolgreichsten und am besten untersuchten Polymerisation von Khorana et al. [45]. Diese Autoren hatten die besten Ergebnisse erzielt, als sie Thymidin-5'-phosphat und 3'-O-Acetyl-Thymidin-5'-phosphat im Verhältnis 3:1 in Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid kondensierten und anschliessend das Polykondensationsprodukt mit Essigsäureanhydrid behandelten, um eventuell entstandene Pyrophosphate zu zerstören. Unser Vorgehen sollte so weit wie möglich analog gehalten werden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Phosphorsäurediester nur sehr langsam mit der sekundären Hydroxylgruppe eines Zuckers reagiert. Aus diesem Grunde schien es unvernünftig, einen 5'-Phosphorsäurediester kondensieren zu wollen. Wir verwendeten deshalb einen 3'-Phosphorsäurediester. Was die Mengenverhältnisse der Reaktanden betrifft, so schien uns die Verwendung von 25 % eines Starternukleotides 1 und 75 % des Kettenbausteines 2 richtig zu sein. Als Kondensationsmittel musste TPS benutzt werden, da DCC, wie ein späterer Versuch zeigte, Diester nicht mehr genügend zu aktivieren vermag. Anschliessend sollten alle Schutzgruppen durch Hydrolyse entfernt und das Polymerengemisch an einer DEAE-Cellulosesäule aufgetrennt werden. Die Pyrophosphatspaltung wurde bewusst unterlassen, um die primären Reaktionsprodukte nachweisen zu können. Es wird somit die nachstehende Reaktionsfolge erwartet:


MeOTr-O-CH2
T
25%
NC-CH2-CH2-O-P=O
OH
1
+
TPS
HOCH2
75%
2
n
1. 80-proz. AcOH
2. NH4OH
O=P-OH

Die Edukte 1 und 2 mussten vom käuflich erhältlichen Thymidin aus hergestellt werden. Die Wahl der Schutzgruppen fiel nicht schwer, da ziemlich stark limitierende Bedingungen von ihnen erfüllt werden mussten. Der Monomethoxytritylrest (MeOTr) als Schutzgruppe drängte sich aus verschiedenen Gründen auf. Er ist gegen Säuren ausserordentlich labil und lässt sich bereits bei Behandlung mit 80-proz. Essigsäure [46] innerhalb von 10 Min. bei 100° vollständig entfernen. Unter diesen milden Bedingungen können weder die N-glykosidische Bindung noch die internukleotidische Phosphorsäureesterbindung angegriffen werden. Ein weiterer Grund liegt in der Selektivität der Reaktion mit Thymidin, indem MeOTr-Cl ausschliesslich die primäre Hydroxylgruppe der Desoxyribose angreift und das Produkt mit hoher Ausbeute liefert.

Für die Wahl des β-Cyanoäthylrestes ($-O-CH_2-CH_2-C\equiv N$) gelten im Prinzip die gleichen Kriterien. Die Abspaltungsbedingungen (konz. NH_4OH, 18 Std. bei 23° [47]) sind so mild, dass keine andere Stelle des Moleküls betroffen werden kann. Ausserdem bleibt die sterische Hinderung bei der Kondensation in einem vernünftigen Mass, sodass man vom Diester noch genügend Reaktivität erwarten kann. Es wäre noch die Trichloräthanolschutzgruppe, die von Eckstein et al. [39] verwendet worden ist, in Frage gekommen. Sie lässt sich aber nur reduktiv abspalten, und es könnten wegen ihrer grossen Raumfüllung sterische Probleme auftreten. Die Ausgangssubstanzen wurden also wie folgt hergestellt:

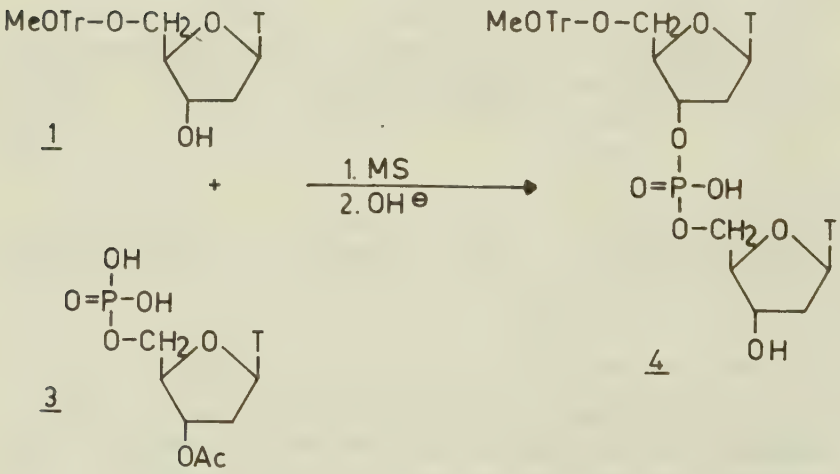


Es mussten nun noch die zu erwartenden linearen Oligonukleotide zu Vergleichszwecken hergestellt werden. Es schien einfacher und sicherer, die durch die Polykondensation entstehenden Produkte mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden zu vergleichen. Ihre Struktur kann durch UV-Messungen und mit Hilfe von enzymatischen Abbaumethoden genau bestimmt werden. Dieses Verfahren versprach einen wesentlich schnelleren Ueberblick über den Erfolg der Reaktion zu geben, da eine aufwendige Reinigung der Polykondensationsprodukte nicht notwendig ist.

Wir wählten den Syntheseweg, der uns möglichst rasch die phosphorylierten und nicht phosphorylierten Oligonukleotide bis zum Pentanukleotid in die Hände geben sollte.

Die schrittweise Synthese nach Khorana [48] schien uns die beste Methode zu sein. Die nachträgliche Phosphorylierung der Produkte (es entstehen Oligonukleotide ohne Endphosphat) führten wir mit der β-Cyanoäthylphosphorsäure durch, da wir mit diesem Reagens über die grösste Erfahrung verfügten.

Reaktionsschema:

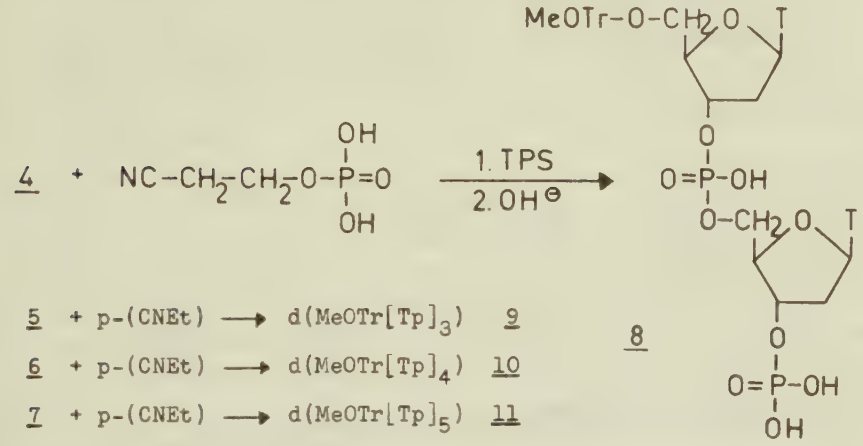


4 + pT_d^{ac} ⟶ d[(MeOTr)TpTpT] 5

5 + pT_d^{ac} ⟶ d[(MeOTr)TpTpTpT] 6

6 + pT_d^{ac} ⟶ d[(MeOTr)TpTpTpTpT] 7

Die Reaktionsgleichung für die Phosphorylierung lautet:

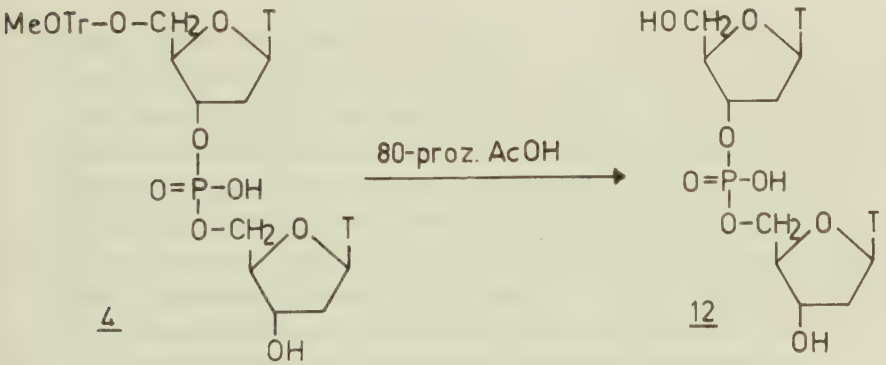


5 + p-(CNEt) ⟶ d(MeOTr[Tp]$_3$) 9

6 + p-(CNEt) ⟶ d(MeOTr[Tp]$_4$) 10

7 + p-(CNEt) ⟶ d(MeOTr[Tp]$_5$) 11

Für die enzymatischen Spaltungen und zur Verwendung als Vergleichssubstanzen mit den Polykondensationsprodukten muss die Tritylgruppe abgespalten werden.



Analog werden alle anderen Nukleotide enttrityliert.

5	⟶ d(TpTpT)	13
6	⟶ d(TpTpTpT)	14
7	⟶ d(TpTpTpTpT)	15
8	⟶ $d(Tp)_2$	16
9	⟶ $d(Tp)_3$	17
10	⟶ $d(Tp)_4$	18
11	⟶ $d(Tp)_5$	19

Der Vergleich der synthetischen Produkte und der Produkte aus der Polykondensation kann nun dünnschicht- und papierchromatographisch erfolgen.

2. Die Herstellung der Ausgangssubstanzen

2.1. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin [$(MeOTr)T_d$]

Nach den Angaben der Literatur [17] wurden Thymidin und p-Methoxytritylchlorid im Verhältnis 1:1 während 18 Std. bei 23° unter Lichtausschluss umgesetzt. Die von den Autoren empfohlene Reinigung des Produktes auf einer Aluminiumoxid-Säule erwies sich als nicht notwendig und ausserdem unbefriedigend (vgl. [53]). Ein vollständig reines Produkt konnte erhalten werden, wenn das Rohprodukt in Benzol, das 1 % Methanol enthielt, gelöst und sehr langsam mit Cyclohexan ausgefällt wurde. So entstand eine ständige, ganz geringe Uebersättigung der Lösung, die bewirkte, dass das geschützte Nukleosid direkt kristallin und analysenrein anfiel. Bei einer zu schnellen Fällung trat eine hohe Uebersättigung auf. Die gesamte Lösung erstarrte dann zu einer gallertartigen Masse durch plötzliches Ausfallen der Substanz und die dadurch bedingten Lösungsmittel-

einschlüsse.

Die Ausbeute konnte auf 94 % der Theorie erhöht werden. Bisher ist es immer unterlassen worden, diese Produkte auch spektroskopisch zu charakterisieren. Die Spektren dürfen aber nicht als Konstitutionsbeweise, sondern nur als Gruppennachweise dienen.

Das 60 MHz-NMR.-Spektrum (Fig. 1) zeigt, dass alle Protonen mit den erwarteten chemischen Verschiebungen und Aufspaltungen vorhanden sind (siehe Exper. Teil). Im IR.-Spektrum (Fig. 2) lassen sich alle funktionellen Gruppen nachweisen (siehe Exper. Teil).

2.2. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat [(MeOTr)T_dp-(CNEt)]

Letsinger et al. [40] liessen äquimolare Mengen an (MeOTr)T_d und β-Cyanoäthylphosphat in Gegenwart von zwei Aequivalenten MS reagieren.

Khorana et al. [17] führten eine analoge Reaktion mit methoxy-freiem Tritylthymidin durch. Sie setzten zwei Aequivalente β-Cyanoäthylphosphat und fünf Aequivalente DCC ein. Beide Autoren haben das Endprodukt jedoch nie isoliert, sondern direkt mit einem weiteren Nukleotid oder Nukleosid umgesetzt. Es mussten deshalb die Bedingungen gefunden werden, welche die Herstellung des Präparates in grösseren Mengen gestatteten. Die Verbindung musste gleichzeitig rein genug sein, um für die Polykondensation eingesetzt werden zu können.

Der Umsatz von (MeOTr)T_d mit β-Cyanoäthylphosphat in Pyridin bei 23° war nach 3 Tagen vollständig. Nach Hydrolyse mit Wasser konnte vom unlöslichen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert werden. Es blieb allerdings eine grössere Menge davon in der Lösung zurück. Die sehr stark polaren und unpola-

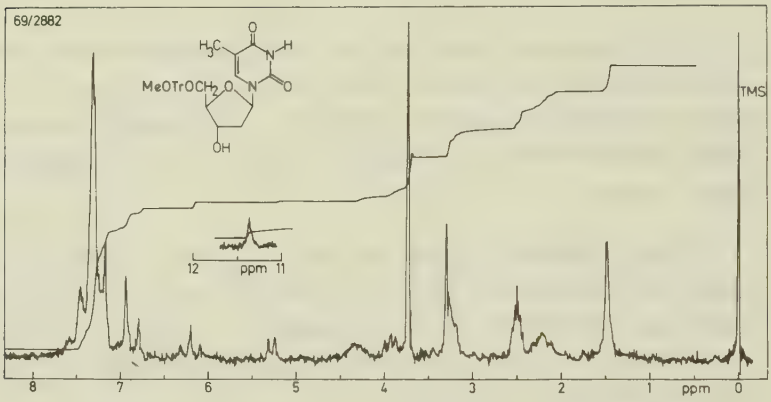


Fig. 1: 60 MHz-NMR.-Spektrum von 5'-O-Monomethoxy-tritylthymidin in $(CD_3)_2SO$

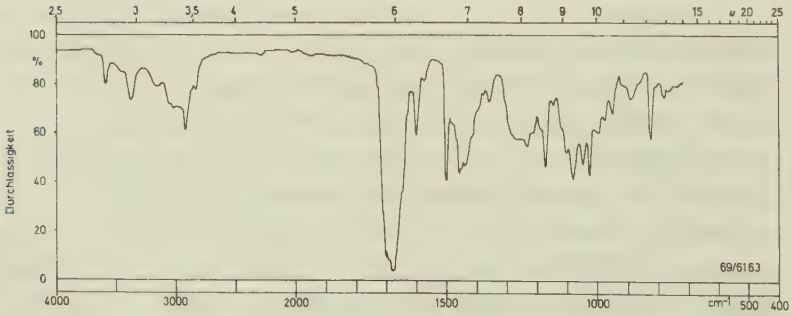


Fig. 2: IR.-Spektrum von 5'-O-Monomethoxy-tritylthymidin

ren Anteile wurden durch eine Verteilungsmethode vom Produkt abgetrennt. Zur Verhinderung von Emulsionen wurde das Filtrat durch Eindampfen vom Pyridin befreit. Bei der Verteilung des Rückstandes zwischen Methylenchlorid und Wasser verblieb das Nukleotid in der Methylenchloridphase. Nach Eindampfen und Lösen des Rückstandes in Wasser wurden Verunreinigungen mit Essigsäureäthylester abgetrennt. Nach Eindampfen der wässerigen Lösung erhielt man das Nukleotid als farblosen Lack, der in Methylenchlorid gelöst und mit trockenem Aether als weisses Pulver gefällt wurde. Die Elementaranalyse des so gereinigten Produktes ergab jedoch viel zu tiefe (6 %) C-Werte.

Es wurde versucht, das Produkt durch eine zweimalige Chromatographie auf Dickschicht in Methylenchlorid-Methanol-(4:1) zu reinigen. Ein Reinigungseffekt war zwar vorhanden (C-Fehler nur noch 4 %), das Vorgehen selbst war aber für einen grösseren Masstab zu aufwendig. Die Reaktionspartner sollten möglichst in einem molaren Verhältnis von 1:1 stehen. Das Kondensationsmittel sollte nur das Phosphat aktivieren.

Da von MS die Sulfonierung sekundärer Hydroxygruppen bekannt ist [45], wurde TPS als Kondensationsmittel verwendet. Es ist wesentlich voluminöser und vermag sekundäre Hydroxygruppen nicht mehr anzugreifen [32].

Der Umsatz der äquimolaren Mengen in Pyridin war nach 4 Std. bei 23° vollständig. Mit einem Ueberschuss Wasser wurde dann hydrolysiert und nach einigen Stunden das Nukleotid, die Triisopropylbenzolsulfonsäure und geringe Reste (MeOTr)T_d mit Chloroform ausgeschüttelt. Kleinere Mengen von Verunreinigungen konnten durch eine Testfällung aus Methylenchlorid mit Aether nicht entfernt werden.

Es wurde nun eine Reinigung durch Chromatografie an Kieselgel versucht. Scheit [49] hat die Trennung von Nukleotid-

Salzen an Kieselgel beschrieben. Dabei werden alkoholischen Fliessmitteln Salzpuffer zugesetzt. Allerdings war ein hohes Verhältnis von Substanz zu Adsorbens (bis 1:500) notwendig. Es wurde dann eine Auftrennung bei einem Verhältnis von 1:200 mit Isopropanol und 0 - 10 % 0,1M $NH_4H\ CO_3$-Lösung versucht. Das isolierte Produkt war zwar im System B (vgl. Exper. Teil) im Dünnschichtchromatogramm (DC) einheitlich, zeigte aber in System C mehrere Flecke. Deshalb wurde eine neue Säulenchromatografie durchgeführt, wobei bei einem Substanz-Adsorbens-Verhältnis von 1:50 Aceton mit steigenden Mengen Methanol und 0,1M NH_4HCO_3-Lösung verwendet wurde. Das aus den Fraktionen 22 - 27 (Fig. 3) isolierte Material war in verschiedenen Fliessmitteln rein und konnte als Ammoniumsalz lyophilisiert werden.

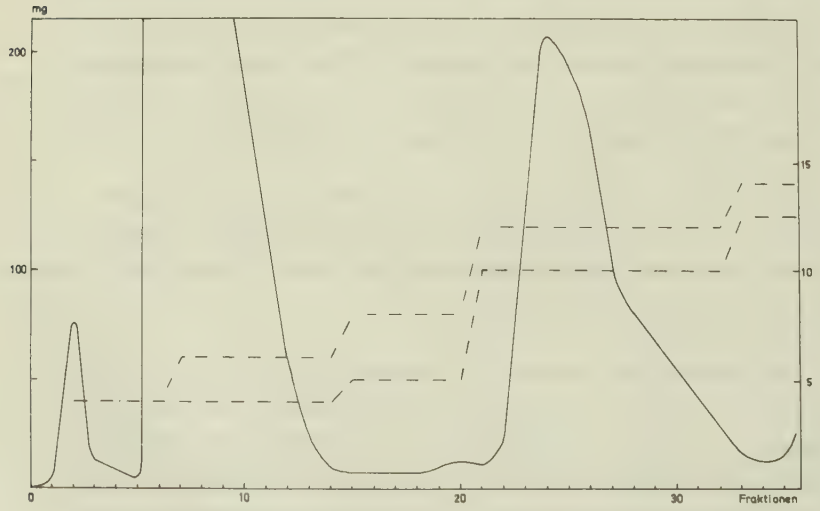


Fig. 3: Isolierung des Nukleotides 1 an Kieselgel.
-.-.- Anteil Methanol in Prozent.
----- Anteil 0,1M NH_4HCO_3 in H_2O in Prozent.

Die Ausbeute war mit 76 % um 4 % geringer als beim Vorgehen mit DCC.

Da das Ammoniumsalz nicht kristallisiert werden konnte, wurden das Cyclohexylammoniumsalz und das Bariumsalz hergestellt. Dabei wurde jeweils der Dowex 50 H^+-Ionenaustauscher mit dem gewünschten Kation beladen und eine Lösung des Pyridiniumsalzes von 1 in Methanol oder Wasser durch die Säule gegeben. Das Cyclohexylammoniumsalz konnte nach einer Reinigung auf Dickschicht ebenfalls nicht zur Kristallisation gebracht werden, während das Ba-Salz auf diese Weise nicht rein darstellbar war. Es wurde festgestellt, dass die Ba-Ionen nur sehr schwer durch die Pyridiniumionen zu verdrängen sind. Es ist nicht möglich, aus dem Nukleotid die freie Säure herzustellen und mit Bariumhydroxid zu neutralisieren, da eine gleichzeitige Abspaltung der Schutzgruppe eintreten würde.

Die in dieser Art durchgeführte Synthese und die Aufarbeitung erfüllten alle Anforderungen, die gestellt worden waren. Es konnte nun in grossen Mengen ein hinreichend reines Produkt hergestellt werden. Wie das NMR.-Spektrum und die Elementaranalyse zeigten, wurden die allerletzten Verunreinigungen jedoch nicht entfernt.

Das 60 MHz-NMR.-Spektrum (Fig. 4) und das IR.-Spektrum (Fig. 5) zeigen aber, dass alle wichtigen Protonen und funktionellen Gruppen vorhanden sind. Ausserdem deutet die chemische Verschiebung der Protonen an C-2',C-3' und C-4' an, dass die Phosphorylierung höchstwahrscheinlich am C-3'-OH erfolgt ist. Das UV.-Spektrum ergab ein log ε von 4.025. Dieser Wert stimmt mit dem von Tritylthymidin innerhalb der Fehlergrenzen überein.

Zur weiteren Reinigung wurde die Trockensäulenchromatografie [50, 51] an "Kieselgel Woelm für Trockensäulen-Chromatografie" herangezogen. Die Versuche scheiterten bis jetzt an

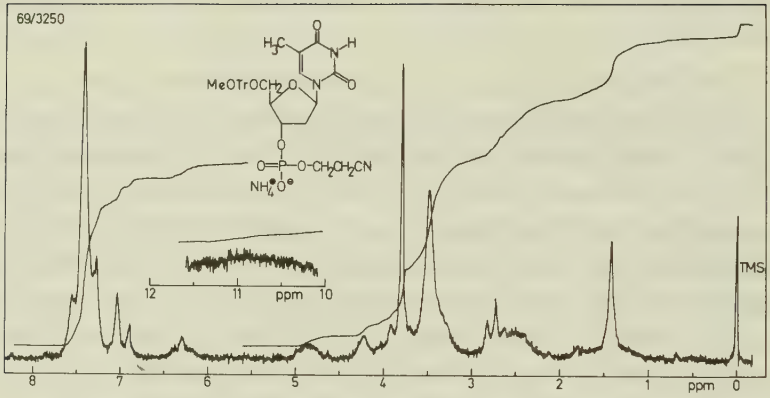


Fig. 4: 60 MHz-NMR.-Spektrum des Nukleotides 1 in $(CD_3)_2SO$

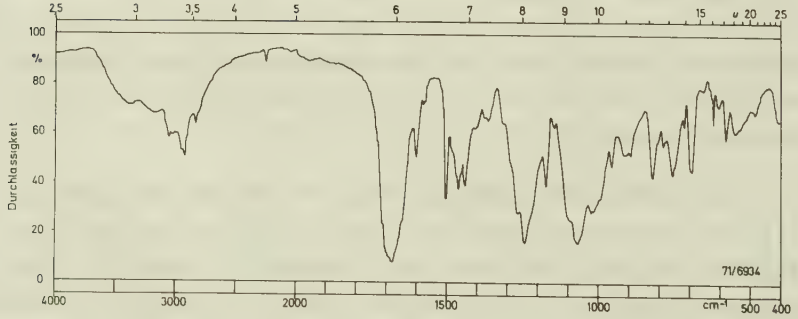


Fig. 5: IR.-Spektrum des Nukleotides 1

der Unzulänglichkeit des UV.-transparenten Materials [2]. Im günstigsten Laufmittel Methylenchlorid-Methanol wurde der Nylonschlauch stark aufgequollen, sodass am Säulenrand eine Kanalbildung auftrat. Die erzielten Resultate berechtigen jedoch zur Hoffnung, dass hier in grösserem Ausmass Trennungen vorgenommen werden könnten. Bei der Entwicklung der Säule mit Essigester konnten fast alle unpolaren Nebenprodukte abgetrennt werden. Zur Rückgewinnung mussten die im UV absorbierenden Zonen lediglich aus der Säule herausgeschnitten und mit Methanol eluiert werden. Versuche mit Glas- oder besser mit Quarzröhren sollten hier zum Erfolg führen, denn alle Laufmittel, in denen das Nukleotid wanderte, griffen den Nylonschlauch zu stark an.

In einem Syntheseversuch wurde auch das in der Peptidchemie sehr häufig verwendete 2- Aethoxy-N-äthoxycarbonyl--1,2-dihydrochinolin (EEDQ) getestet. In den bisher durchgeführten Versuchen liess sich jedoch kein Beginn einer Reaktion feststellen.

2.3. Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat [T_dp-(CNEt)]

Mit 80%proz. Essigsäure bei 100° liess sich die MeOTr-Schutzgruppe innerhalb weniger Minuten als wasserunlöslicher Tritylalkohol abspalten. Nach mehrmaligem Eindampfen und Aufnehmen in Wasser zur Entfernung des p-Methoxytritylalkohols und der Essigsäure wurde das Pyridiniumsalz von 2 als ein farbloser harter Lack erhalten, der sich weder kristallisieren noch fällen liess. Zur besseren Handhabung der Substanz wurde das Bariumsalz hergestellt. Durch den Kationenaustauscher Dowex 50 H^+

2) Schlauchfolie "Rilsan", Chemische Fabrik Budenheim, D-6501 Budenheim.

wurde die Säure freigesetzt und mit 0,01N $Ba(OH)_2$-Lösung unter Kühlung und starkem Rühren auf pH 7 neutralisiert. Es war grosse Vorsicht notwendig, da ein Ueberschuss $Ba(OH)_2$ an der Eintropfstelle sofort die β-Cyanoäthyl-Schutzgruppe abspalten würde. Das Bariumsalz wurde in wenig wässerigem Aethanol gelöst und nach Fällung mit einem Ueberschuss Aceton als weisses Pulver erhalten. Im Dünnschichtchromatogramm wies das Präparat eine geringe Verunreinigung in Form eines Startflecks auf. Der Begleitstoff konnte durch eine Filtration über mit heissem Methanol gewaschenen Kieselgel beseitigt werden. Das Salz wurde nochmals auf die beschriebene Weise gefällt und ergab in 92 % Ausbeute ein analysenreines Präparat vom Smp. 224 - 228° [3].

Das phosphatgeschützte Nukleotid 2 wurde sorgfältig charakterisiert, um auch die Struktur des nicht völlig reinen Nukleotids 1 zu sichern.

Das UV.- Spektrum ist dem von Thymidin ähnlich und besitzt innerhalb der Fehlergrenze den gleichen ε-Wert.

Das IR.- Spektrum (Fig. 6) zeigt alle erwarteten funktionellen Gruppen. Zum Vergleich wurde ein IR.-Spektrum von Ba-β-Cyanoäthylphosphat aufgenommen. In diesem Spektrum fehlt die P=O-Streckschwingung bei etwa 1250 cm^{-1}, während im Spektrum der Verbindungen 1 und 2 diese Bande eindeutig vorhanden ist. Die P=O-Schwingung ist deshalb nicht sichtbar, weil die π-Elektronen durch Resonanz über die zwei noch freien HO-Gruppen gleichmässig verteilt sind. Diese Resonanz ist in den Substanzen 1 und 2 offenbar durch Veresterung gestört, wie das Auftreten einer starken Schwingung bei 1220 cm^{-1} vermuten lässt.

---

3) In der Schmelze erschienen längliche Nadeln, die bei 250° schlagartig schmolzen. Das lässt vermuten, dass das Salz unter Umständen kristallisierbar ist.

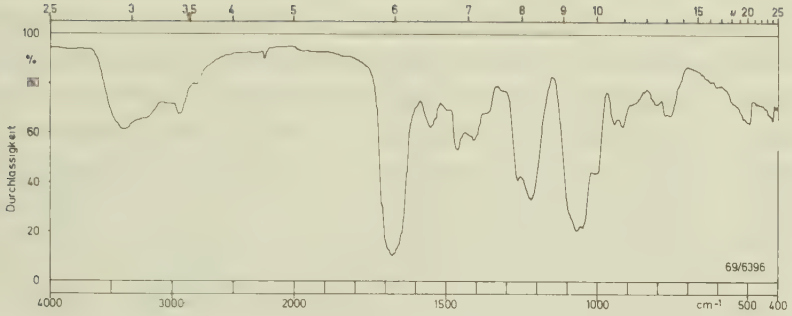


Fig. 6: IR.-Spektrum des Nukleotides 2

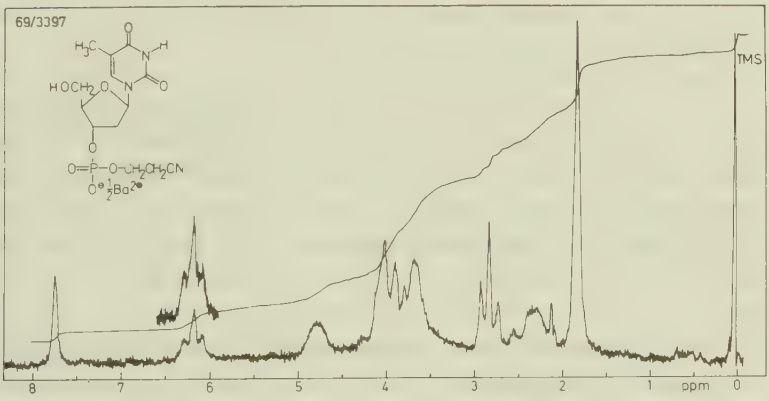


Fig. 7: 60 MHz-NMR.-Spektrum des Nukleotides 2 in $(CD_3)_2SO$

Im 60 MHz-NMR.- Spektrum (Fig. 7) verdeckt Kristallwasse den Bereich von δ = 4,3 - 3,0 ppm. Dennoch zeigt sich die deutliche Abwesenheit der aromatischen Protonen, während alle anderen wichtigen Signale der Base, des Zuckers und der Phosphorsäureschutzgruppe vorhanden sind. Der Vergleich mit dem 60 MHz-NMR.- Spektrum des Natriumsalzes der β-Cyanoäthylphosphorsäure zeigt, dass das Triplett bei δ = 2,82 ppm der Schutzgruppe zuzuordnen ist. Sie ergibt ein zusätzliches breites 4-Linien Signal, das aber in 2 wie C-5'OH und C-5'H_2 in dem von Wasser verdeckten Bereich liegt. Den Beweis für das Vorliegen eines 3'-Phosphorsäureesters erbrachte eine Inkubation [4] des Produktes mit der 5'-Nukleotidase aus Crotalus adamanteus, nachdem die β-Cyanoäthylschutzgruppe mit konz. NH_4OH abgespalten worden war. Das Nukleotid war vollständig stabil [31].

2.4. 5'-O-Monomethoxytrityl-Thymidin-3'-(bis-β-cyanoäthyl)-phosphat [(MeOTr)T_dp-$(CNEt)_2$]

Die Herstellung von (MeOTr)T_dp-$(CNEt)_2$ wurde unternommen, um zu prüfen, ob man die entstehenden Polymeren, die am endständigen Phosphat noch eine freie Phosphorsäure-OH-Gruppe besitzen, tatsächlich in vernünftiger Menge zum Triester kondensieren kann, um das so entstehende Gemisch an Kieselgel zu chromatografieren.

(MeOTr)T_dp-(CNEt) wurde mit getrocknetem β-Cyanoäthanol in 40-fachem Ueberschuss mit DCC und TPS als Kondensationsmitteln 3 Tage in Pyridin kondensiert. Beim Versuch mit DCC liess sich nach dieser Zeit kein Triester feststellen. Beim Versuch mit TPS hatte sich ein tritylhaltiges unpolares Produkt gebildet. Nach Hydrolyse mit Wasser wurde mit Aether ex-

---

4) Ich danke Herrn Dr. U. Séquin für die Durchführung des Versuchs.

trahiert und der Aetherextrakt auf Kieselgel mit Chloroform-Methanol aufgetrennt. Dabei fiel der Triester in 63 % Ausbeute an. Das Präparat zeigte nach Umfällung aus Benzol-Cyclohexan den Smp. 70 - 74°. Nach Abspaltung der Schutzgrupppen war das Material identisch mit T_dp.

Dieses Resultat bedeutet, dass es wahrscheinlich nicht möglich ist, die Polymeren auf diese Weise in Triester umzuwandeln. Die Reaktion ist zu langsam und nicht vollständig. Auch ist zu befürchten, dass bei grösserer Kettenlänge die Ausbeuten immer stärker sinken, was zur Folge hätte, dass man die höheren Polymeren nicht mehr in genügender Menge erfassen könnte.

3. Die Herstellung der Vergleichssubstanzen

3.1. 5'-O-Monomethoxytritylthymidylylthymidin [(MeOTr)T_dpT_d]

Als Ausgangsprodukte waren d[(MeOTr)TpTac] und d(TpT) [5] vorhanden. Um das gewünschte Ausgangsmaterial zu erhalten, musste entacyliert oder mit p-Methoxytritylchlorid umgesetzt werden. Die Entacylierung gelang mit konz. NH_4OH bei 60° in 5 Std. In einem Versuch wurde diese Lösung direkt eingedampft und mit Pyridin-Aether gefällt. Bei diesem Vorgehen trat jedoch eine Abspaltung der Tritylgruppe zu etwa 20 % auf. Sie konnte durch Zugabe von etwas NH_4HCO_3 vor dem Einengen der Lösung verhindert werden. Auch Zusätze von Pyridin während des Eindampfens erwiesen sich als nützlich zur Unterdrückung der Abspaltung. Diese Vorsichtsmassnahmen wurden bei allen späteren Versuchen strengstens beachtet. Eine erneute Abspaltung der p-Me-

5) Hergestellt von Dr. H. Türler, Institut für Organische Chemie der Universität Basel.

thoxytritylgruppe trat nicht mehr auf. Die Tritylierung erfolgte analog zur Literaturangabe [17]. Statt der Tritylgruppe wurde jedoch die p-Methoxytritylgruppe eingeführt. Das Reaktionsgemisch konnte leicht auf Papier getrennt werden.

Eine genaue Charakterisierung der Produkte war in diesem Stadium nicht möglich, da einige Verunreinigungen vorhanden waren (bereits in den Ausgangsmaterialien). Bei der Herstellung von 8 (Fig. 11) konnte jedoch sehr reines Dinukleotid 4 isoliert werden. Nach der Umwandlung in 12 durch Abspaltung der MeOTr-Gruppe wurde das Präparat mit Schlangengiftphosphodiesterase in pT_d und T_d im Verhältnis 0,91 gespalten. Solche enzymatischen Spaltungen gelten als die sichersten Methoden zur Identifizierung von Polynukleotiden. Grosser Wert ist jeweils auf die Vollständigkeit der Spaltungen zu legen, denn eine Untersuchung der Reaktion hat gezeigt, dass die Schlangengiftphosphodiesterase eine freie 3'-Hydroxygruppe des Zuckers zum Angriff benötigt, um dann schrittweise nur 3'→5'-Phosphodiesterbindungen zu spalten [10]. (Ein weiter unten beschriebener Spaltungsversuch mit dem Pentanukleotid 15 bestätigt diese Annahme. Es waren alle kürzeren Nukleotidketten sichtbar). Pyrophosphate, 3'→3'- oder 5'→5'-Bindungen werden vom Enzym nicht angegriffen. Die Milzphosphodiesterase reagiert ähnlich, nur lagert sie sich an eine 5'-Hydroxygruppe des Zuckers an. Wenn also ein Polynukleotid vollständig gespalten wird, so bedeutet dies, dass im Substrat ausschliesslich die natürlichen 3'→5'-Phosphodiesterbindungen vorhanden sind und dass das Präparat rein ist.

3.2. 3'-O-Acetylthymidin-5'-phosphat (pT_dac)

Das käufliche Natriumsalz von pT_d wurde durch einen Ionenaustauscher in das Pyridiniumsalz umgewandelt und in absolutem Pyridin mit Essigsäureanhydrid 24 Std. bei 23° acetyliert. Das

eingedampfte Rohprodukt wurde dann aus Pyridin mit abs. Aether gefällt. Die Reaktion war vollständig und ergab keine im UV. absorbierende Nebenprodukte mit Ausnahme einer minimalen Verunreinigung, die bereits im Ausgangsmaterial sichtbar war. Das Produkt war im Dünnschichtchromatogramm einheitlich und unpolarer als pT_d.

3.3. Die Thymidinoligonukleotide 5, 6 und 7

Da diese Synthesemethode hinreichend bekannt ist, soll im folgenden nur kurz auf die vorgenommenen Abwandlungen hingewiesen werden.

Das Oligonukleotid und pT_dac wurden sorgfältig nach dem üblichen Verfahren getrocknet, um letzte Spuren von Feuchtigkeit zu entfernen, und mit MS als Pyridinlösung umgesetzt. Beim Tetra- und Pentanukleotid wurden erst pT_dac und MS zusammen aktiviert und dann nach 5 bzw. 10 Minuten das Oligonukleotid zugesetzt. Nach 16 Std. wurde der Ueberschuss an MS mit Wasser hydrolysiert und das Gemisch unter den früher beschriebenen Vorsichtsmassnahmen eingedampft. Durch Erhitzen mit konz. NH_4OH konnte dann die Acetylgruppe entfernt und nach nochmaligem Eindampfen das ganze Reaktionsgemisch auf einer DEAE-Cellulosesäule in Carbonatform getrennt werden. Die linearen Gradienten und die Durchflussgeschwindigkeiten waren sich jeweils ähnlich.

Die molaren Verhältnisse der Versuche sind aus Tabelle 1 ersichtlich:

Tabelle 1

Edukt		pT_dac	MS	Produkt
4	1	2	7	5
5	1	5	10	6
6	1	10	35	7

Nach mehrfachem Eindampfen der Fraktionen und anschliessender ausgedehnter Lyophilisation, die die letzten Reste von Ammoniumbicarbonat entfernte, waren alle Produkte chromatografisch einheitlich.

Das Trinukleotid 5 befand sich in den Fraktionen 182-260 der Trennung nach Fig. 8. Der ε-Wert im UV stimmte mit dem Literaturwert überein. Eine Spaltung des detritylierten Produktes 13 mit Schlangengiftphosphodiesterase ergab ein Verhältnis pT_d/T_d von 1,88 (theoretisch 2,0). Die Spaltung war vollständig.

Das aus den Fraktionen 261-350 der Trennung nach Fig. 9 gewonnene Tetranukleotid 6 zeigte einen ε-Wert im UV., der mit dem Literaturwert übereinstimmte. Die Spaltung von 14 mit Schlangengiftphosphodiesterase zeigte ein Verhältnis pT_d/T_d von 2,7 (theoretisch 3,0).

Das Pentanukleotid 7 wurde aus den Fraktionen 474-513 der Trennung nach Fig. 10 isoliert. Der ε-Wert entsprach dem Literaturwert. Die Bestimmung des Nukleotid/Nukleosid-Verhältnisses durch Spaltung von 15 mit Schlangengiftphosphodiesterase konnte hier nicht exakt durchgeführt werden. Obwohl das UV.-Spektrum des Oligonukleotides einwandfrei war, enthielt das UV.-Spektrum des durch die Spaltung entstandenen Thymidin-5'-phosphates eine zusätzliche Bande bei 253 nm. Das messbare Verhältnis war aber 3,1 statt 4,0 (theoretisch). Die Fehlerstelle konnte dann eindeutig durch die Spaltung mit Milzphosphodiesterase zu T_dp und T_d ermittelt werden. Die zusätzliche Bande tauchte diesmal im Spektrum des Thymidins auf. Dies bedeutet, dass der falsche Chromophor (ev. ein MS-Sulfonierungsprodukt) sich im zuletzt angefügten Glied des Pentanukleotides befindet. Die Verunreinigung ist sehr schwach, da sie erst sichtbar wird, wenn das fehlerhafte Teilstück isoliert ist. Trotz dieses Fehlers wurde das Nukleotid als Vergleichsmaterial und Ausgangsmaterial zur Phosphorylierung verwendet.

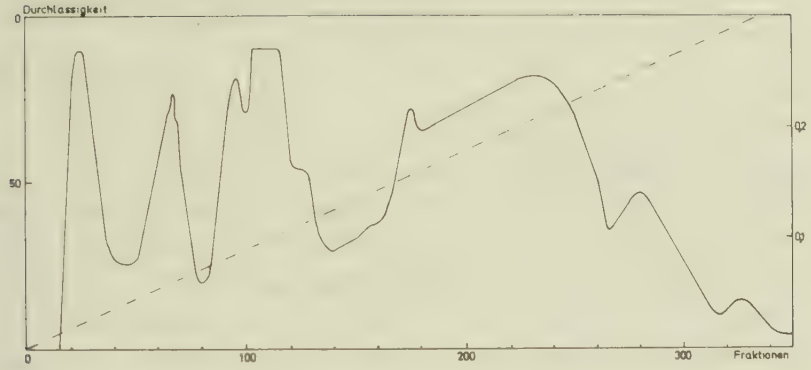


Fig. 8: Chromatografie des Trinukleotides an DEAE-Cellulose

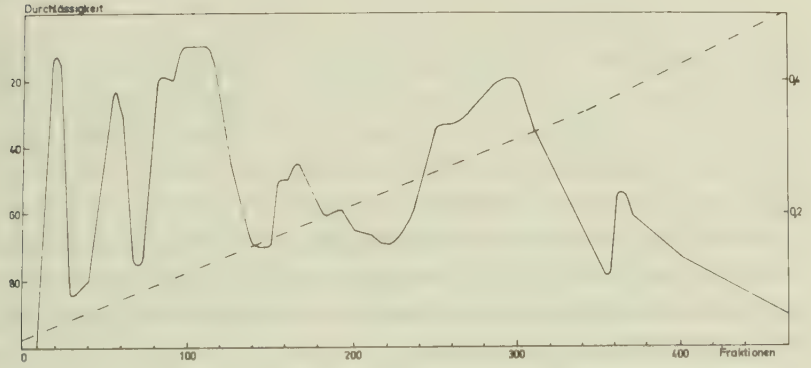


Fig. 9: Chromatografie des Tetranukleotides an DEAE-Cellulose
Die gestrichelte Linie gibt die Molarität an NH_4HCO_3 an.

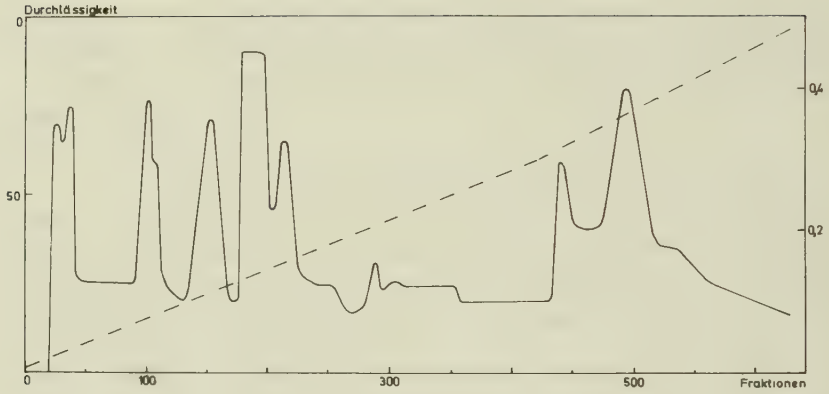


Fig. 10: Chromatographie des Pentanukleotides an DEAE-Cellulose. Die gestrichtelte Linie bedeutet die Molarität an NH_4HCO_3.

Das Präparat war chromatografisch völlig einheitlich und passte ausserdem in die homologe Reihe der Oligonukleotide 4 bis 6. Die Vollständigkeit des enzymatischen Abbaus zeigte auch, dass die internukleotidischen Verknüpfungen intakt waren, der Fehler also in einer Veränderung oder Substitution der Base zu suchen ist. Für einen chromatografischen Vergleich aber würde ein solcher Fehler kaum ins Gewicht fallen, da es hier mehr auf das Verhältnis der negativen Ladung zum Gesamtneutralteil des Moleküls ankommt.

Interessant ist ein Vergleich der drei Elutionsdiagramme (vgl. Fig. 8 - 10). Die Kurve nimmt in allen Fällen einen ähnlichen Verlauf und ist ähnlich komplex, was darauf hindeutet, dass der Reaktionsmechanismus unabhängig von der molaren Zusammensetzung und der Kettenlänge ist. Es entstehen offenbar immer analoge Nebenprodukte.

4. Die Phosphorylierungsreaktionen

4.1. Allgemeines

Phosphorylierungen von Oligonukleotiden des Typs 4 wurden bisher nur in einzelnen Fällen mit DCC als Kondensationsmittel beschrieben. Letsinger verwendete bei Phosphorylierungen von Triestern mit β-Cyanoäthylphosphat [40] MS. Wir verwendeten TPS als Kondensationsmittel wegen der einfacheren Arbeitsweise gegenüber DCC und der schon erwähnten geringen Fähigkeit, primäre oder sekundäre Hydroxylgruppen zu sulfonieren.

Die Durchführung der Reaktion soll wiederum allgemein beschrieben werden, da sie in allen Fällen ähnlich zur Ausführung gelangte. Um gleichbleibende Ausbeuten zu erhalten ist es notwendig, die Zahl der Zusammenstösse von Reaktionszentren auf gleicher Höhe zu halten. Da die Ausbeuten in bezug auf das Nukleotid wichtig waren, wurde die Konzentration von β-Cyanoäthylphosphat in den Reaktionslösungen ständig gesteigert.

Im Allgemeinen wurde so vorgegangen, dass das molare Verhältnis von Nukleotid zu β-Cyanoäthylphosphat und TPS variiert wurde (vgl.Tab. 2). Ein Gemisch von Nukleotid und einer Stammlösung von Pyridinium-β-Cyanoäthylphosphat wurde durch mehrfache Destillation mit abs. Pyridin von Spuren Wasser befreit. Unter Feuchtigkeitsausschluss wurden dann möglichst rasch TPS und Pyridin als Lösungsmittel und Abfänger der entstehenden Sulfonsäure zugesetzt. Die Reaktionszeit betrug bei Raumtemperatur 6 Std., oder 20 Std. im Fall des Dinukleotides. Unter intensiver Kühlung wurde dann mit Wasser vorsichtig hydrolysiert, um eine Ueberhitzung zu vermeiden. Nach 5-stündiger Hydrolyse bei 23° wurde ein grosser Ueberschuss von konz. NH_4OH zugegeben, um die β-Cyanoäthanolschutzgruppe abzuspalten. Anschliessend wurde zur Entfernung des Ammoniaks

eingedampft, der Rückstand total in wässerigem Aethanol gelöst und an einer DEAE-Cellulosesäule (Karbonatform) durch einen linearen Ammoniumbikarbonat-Alkohol-Gradient mit konstantem pH 8,5 - 9,0 getrennt. Mit Ausnahme des Tetranukleotides entstanden bei allen Synthesen nur zwei tritylhaltige Hauptprodukte. Die beiden Substanzen erschienen relativ dicht hintereinander, bei tieferer Polarität jeweils das nicht umgesetzte Edukt, bei höherer Polarität in der Regel das phosphorylierte Ausgangsmaterial.

Tabelle 2

Nukleotid NH_4^+-Salz		β-Cyanoäthylphosphat Pyridinium-Salz	TPS	Reaktionszeit (Std.)	Produkt
4	1	2	8	20/ 2°	8
5	1	3	10	6/22°	9
6	1	4	15	6/22°	10
7	1	5	15	7/22°	11

4.2. Die Phosphorylierung des Thymidindinukleotides 4

Nukleotidisches Material war nach dem UV.-Spektrum nur in den Spitzen C, D, E und F des Chromatogramms des Rohproduktes (Fig. 11) nachzuweisen. Spitze H enthielt Pyridin, Spitze B Triisopropylbenzolsulfonsäure, die beim Eindunsten der Eluate kristallisierte und durch Mischschmelzpunkt identifiziert wurde. Die Inhaltsstoffe der Spitzen C und F waren detritylierte Polynukleotide, die nicht weiter untersucht wurden. Diese bei den Phosphorylierungen immer auftretende Detritylierung ist wahrscheinlich für die relativ schlechten Ausbeuten, sie liegen um 45 %, verantwortlich. Spitze D enthielt nach dünnschichtchromatografischem Test das Dinukleotid 4 in 20 % Ausbeute. (Mit diesem Präparat wurde die enzymati-

sche Spaltung zum Beweis der Kettenlänge des Dinukleotides vorgenommen). Spitze E enthielt das phosphorylierte Dinukleotid 8 in 36 % Ausbeute. Es konnte mit Hilfe enzymatischer Methoden eindeutig bestimmt werden. Die Spaltung mit Monophosphatase ergab als einziges Produkt das Dinukleotid 4. Die vollständige Spaltung mit Milzphosphodiesterase zu T_dp bewies das Vorhandensein der 3'→5'-internukleotidischen Bindung. Die Substanz war chromatografisch einheitlich und zeigte das UV.-Spektrum von Thymidin.

4.3. Die Phosphorylierung des Thymidintrinukleotides 5

Nach dem UV.-Spektrum befand sich in den Spitzen C, D, E und F des Chromatogramms des Rohproduktes (Fig. 12) nukleotidisches Material. Spitze A enthielt Pyridin, Spitze B Triisopropylbenzolsulfonsäure. In Spitze C fand sich ein Oligonukleotidderivat, das nicht näher untersucht wurde. Nur die Spitzen D, E und F waren tritylhaltig, wobei sich E als ein Gemisch aus den Substanzen in D und F erwies. Nach dem chromatografischen Vergleich handelte es sich beim Material aus D um das nicht umgesetzte Edukt. Das Material aus Spitze F erwies sich als das phosphorylierte Trinukleotid 9. Die Substanz war chromatografisch einheitlich. Inkubation (nach Enttritylierung) mit Monophosphatase ergab das Trinukleotid 5 als einziges Produkt Milzphosphodiesterase führte zu einer vollständigen Spaltung zu Thymidin-3'-phosphat. Infolgedessen lag eine 3'→5'-internukleotidische Bindung vor. Die Ausbeute war besser als beim Dinukleotid und betrug 47 %. Der Grund hierfür dürfte auch in der Reinheit des Ausgangsmaterials liegen. Das Dinukleotid 4 war im Gegensatz zum Trinukleotid 5 nicht chromatografisch gereinigt worden.

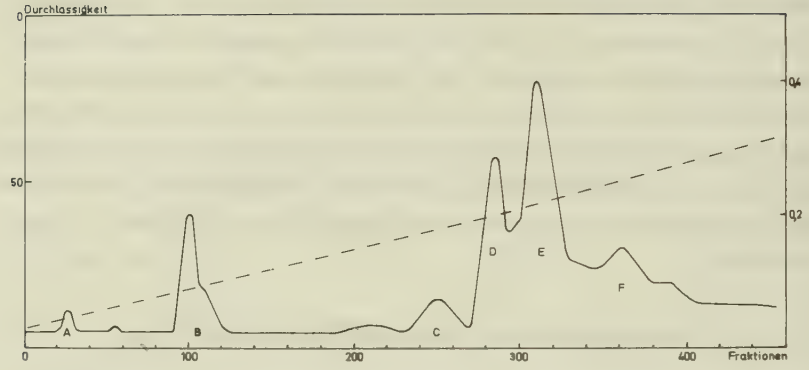


Fig. 11: Chromatografie von d[(MeOTr)$(Tp)_2$] an DEAE-Cellulose. -----Molarität NH_4HCO_3

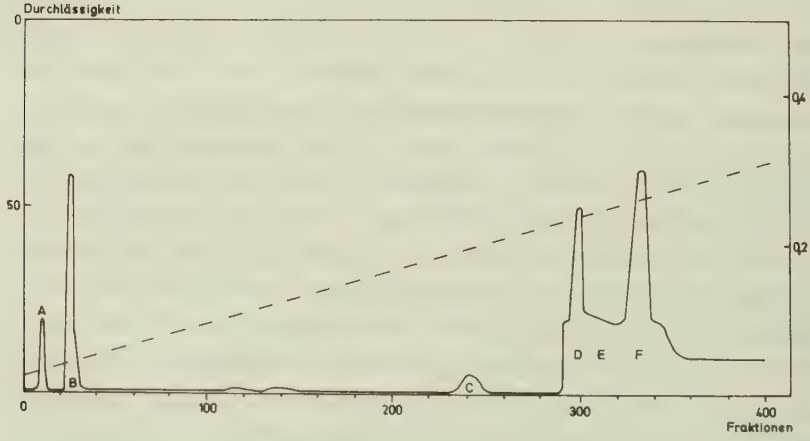


Fig. 12: Chromatografie von d[(MeOTr)$(Tp)_3$] an DEAE-Cellulose. ----- Molarität NH_4HCO_3

4.4. Die Phosphorylierung des Thymidintetranukleotides 6

Das Elutionsdiagramm sieht wesentlich komplexer aus als in den vorhergegangenen Versuchen. Der Grund liegt in der Verwendung einer UV.-Zelle grösseren Durchmessers. Normalerweise wurde eine 3mm-Zelle eingesetzt, bei diesem Versuch jedoch, um die Vielfalt der entstehenden Produkte zu erkennen, eine 1cm-Rundzelle. Die Menge der einzelnen Unreinheiten war allerdings äusserst gering. Fraktionen von der Grössenordnung D enthalten je etwa 0,5 mg Material. Tritylhaltige Substanzen fanden sich in den Spitzen E, F und G des Chromatogramms (Fig. 13). Alle anderen, ausser A und B, enthielten nukleotidisches Material. Nach Dünnschichtchromatografie lag die Vermutung nahe, dass sich in der Gruppe H detrityliertes Material aus E und G befand. Spitze A bestand aus Pyridin, Spitze B aus Triisopropylbenzolsulfonsäure. Gruppe D wurde nicht untersucht. Peak E beinhaltete nach chromatografischem Vergleich das Edukt 6 mit 5 % Ausbeute. Spitze G enthielt das gesuchte Nukleotid 10 in 15 % Ausbeute, das wie folgt identifiziert werden konnte:

Das Produkt war chromatografisch einheitlich. Die Spaltung mit Monophosphatase ergab das Nukleotid 6 als einziges Produkt. Inkubation mit Milzphosphodiesterase führte zu einer vollständigen Spaltung zu Thymidin-3'-phosphat. Alle internukleotidischen Bindungen waren demnach korrekt.

Die Polarität des Materials der Spitze F lag zwischen der von 6 und 10 (Ausbeute 30 %). Das legte die Vermutung nahe, dass die Abspaltung der β-Cyanoäthylschutzgruppe nicht vollständig gewesen war. Im Gegensatz zu den anderen Versuchen war die Hydrolyse mit konz. NH_4OH während 48 Std. bei 4° durchgeführt worden. Das genügte offenbar nicht zur vollständigen Abspaltung. Sie konnte durch nochmaliges Erwärmen mit konz. NH_4OH auf 60° innerhalb von 30 Min. beendet werden. Hierauf

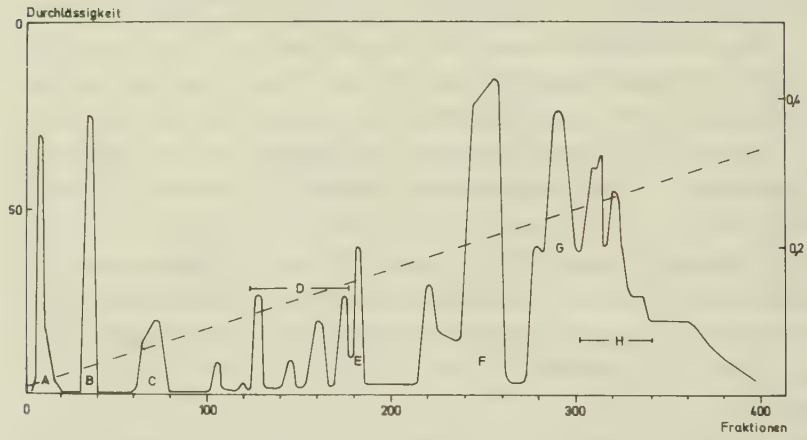


Fig. 13: Chromatografie von d[(MeOTr)$(Tp)_4$] an DEAE-Cellulose. ----- Molarität NH_4HCO_3

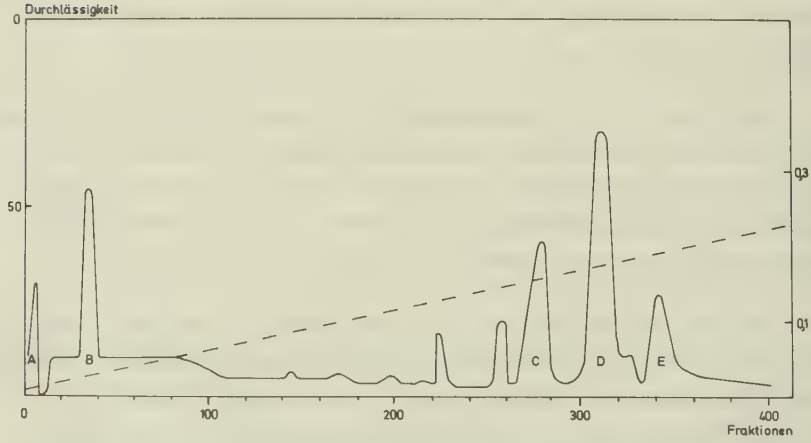


Fig. 14: Chromatografie von d[(MeOTr)$(Tp)_5$] an DEAE - Cellulose. ----- Molarität NH_4HCO_3

war das Material im Dünnschichtchromatogramm identisch mit 10. Nach der Detritylierung wurde dies durch die Verhaltensweise bei der enzymatischen Spaltung bestätigt. Die Gesamtausbeute an reinem Tetranukleotid 10 betrug somit 45 %.

4.5. Die Phosphorylierung des Thymidinpentanukleotides 7

Nach den UV.-Spektren enthielten die Spitzen C, D und E des Chromatogramms (Fig. 14) nukleotidisches Material, davon waren die Substanzen aus C und D tritylhaltig. A enthielt Pyridin, B die Triisopropylbenzolsulfonsäure. Beim chromatografischen Vergleich erwies sich das Material in Spitze C als identisch mit dem Pentanukleotid 7. Die Verbindung in Spitze D war wesentlich polarer und wurde enzymatisch als phosphoryliertes Pentanukleotid 11 identifiziert. Das Nukleotid war chromatografisch einheitlich und wurde von Monophosphatase total zu 7 gespalten. Bei der Inkubation mit Milzphosphodiesterase entstand Thymidin-3'-phosphat als einziges Produkt. Die Hydrolyse war vollständig, somit lagen nur 3'⟶5'-internukleotidische Bindungen vor.

Die Detritylierung aller bis jetzt beschriebenen p-Methoxytrityl-oligonukleotide, die nötig ist, um enzymatische Versuche anzustellen und den direkten Vergleich mit dem Polykondensat zu ermöglichen, ist für kleine Mengen im experimentellen Teil genau beschrieben.

5. Die Polykondensation von Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat [T_dp-(CNEt)]

Zur Reaktion musste das Bariumsalz von 2 mit Hilfe eines Kationenaustauschers in das Pyridiniumsalz übergeführt werden. Dies wurde durch die Freisetzung der Säure mit Dowex 50 H^+

und anschliessende Neutralisation mit Pyridin erreicht. Die Lösung wurde durch zweimaliges Abdampfen mit abs. Pyridin von der grössten Menge Wasser befreit. 1 wurde als trockenes Pulver zugegeben und das Gemisch in Pyridin gelöst. Die Trocknung der beiden Komponenten erfolgte nach den üblichen Methoden. Die Luft zur Entlastung des Hochvakuums wurde durch Phosphorpentoxid getrocknet. Um einen Zutritt von Luftfeuchtigkeit auszuschliessen, wurde TPS als Lösung in Pyridin mit einer Spritze zugegeben. Innerhalb von vier Tagen ging das Kondensationsmittel in Lösung, während gleichzeitig eine ständige Abnahme der Edukte zu beobachten war. Um die Reaktion zu vervollständigen, wurde nochmals TPS zugesetzt, welches sich langsam während einiger Tage löste. Nach 12 Tagen war noch etwas Edukt übrig. Eine weitere Umsetzung war nicht bemerkbar. Deshalb wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser unterbrochen. Auf die übliche Weise wurden dann beide Schutzgruppen abgespalten und 1 mM Polykondensat auf eine DEAE-Cellulosesäule gebracht. Um die Nebenprodukte Methoxytritylalkohol und β-Cyanoäthanol auszuwaschen, wurde die Säule vor der Elution mit 25-proz. wässerigem Aethanol gespült. Es wurde speziell darauf geachtet, dass sämtliche Substanzen auf die Säule kamen. Der Tritylalkohol bildete beim Eindampfen immer einen klebrigen, zähen Überzug, der andere Substanzen mit einschloss. Filtrationen wurden auch deshalb vermieden, weil die Wasserlöslichkeit höherer Polynukleotide sinkt. Das beschriebene Vorgehen garantiert die Anwesenheit aller amonischer Anteile auf der Säule. Als Elutionsmittel wurde ein wässeriger linearer Ammoniumbicarbonat-Gradient verwendet (vgl. Exper. Teil).

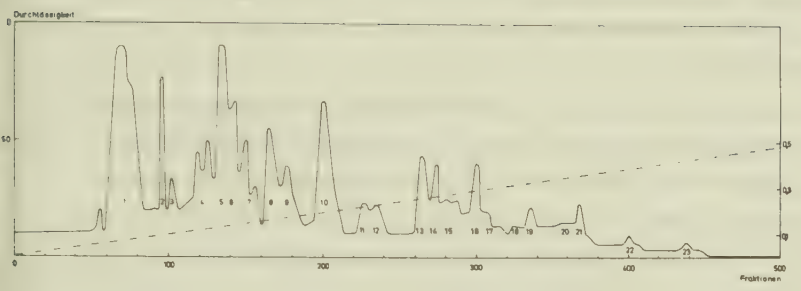


Fig. 15: Auftrennung des Polykondensationsgemisches an DEAE-Cellulose. ----- Molarität NH_4HCO_3

Das Elutionsdiagramm (Fig. 15) ergab ein äusserst komplexes Bild. Offenbar entstanden verschiedene Serien von Verbindungen. Innerhalb einer Serie nahm die Menge der einzelnen Produkte mit steigender Kettenlänge stark ab. Deutlich aber unterscheiden liess sich eine Folge von Hauptprodukten in den Spitzen 1, 5, 10, 13, 16, 19, 21, 22, 23, deren Absorptionen fast gleichmässig abnehmen. Erste Hinweise für die Struktur der Produkte gab das chromatografische Verhalten. Bei der Verbindung in Spitze 8 zum Beispiel scheint es sich um das bekannte cyclische Dinukleotid zu handeln, in Spitze 11 um das cyclische Trinukleotid. Die Substanzen in den Spitzen 2, 3 und 4 zeigten ein von Thymidin verschiedenes UV.-Spektrum. Es dürfte sich dabei um Sulfonierungsprodukte handeln. Die Triisopropylbenzolsulfonsäure trat im Bereich der Fraktionen 110 - 160 auf. Sie wirkte aber nicht störend auf die nachfolgenden Untersuchungen. Eine genauere Identifizierung dieser Nebenprodukte wurde nicht vorgenommen.

Die Hauptprodukte wurden nun nach folgenden Kriterien untersucht und identifiziert.

a) Position auf der Säule:

Aus früheren Trennungen von Polykondendationsprodukten auf DEAE-Cellulose (z. B. [22]) und aus theoretischen Ueberlegungen (Verhältnis von Ladungsmenge zu Nukleotideinheiten) geht hervor, dass die Nukleotide mit höherer Kettenlänge bei höherer Polarität erscheinen müssen. Die Reihenfolge der Elution ist damit praktisch vorgegeben.

b). Bildung von homologen Reihen:

Ihren Eigenschaften als Polymere entsprechend, müssen die linearen Polynukleotide in ihren Rf-Werten auf Dünnschicht und Papier homologe Reihen bilden. Khorana wertet dies als ein sehr wichtiges Kriterium [22].

c) Spaltung mit Monophosphatase:

Nur die linearen Oligonukleotide besitzen eine endständige Phosphorsäuregruppierung. Nebenprodukte wie cyclische Oligonukleotide oder Pyrophosphate werden von der Monophosphatase nicht angegriffen. Falsche Glieder in der homologen Reihe werden auf diese Weise erkannt.

d) Bildung einer homologen Reihe durch die Spaltprodukte:

Die durch die Monophosphatase entstehenden Produkte müssen eine homologe Reihe der dephosphorylierten Oligonukleotide bilden.

Die Kombination dieser 4 Kriterien erlaubt eine eindeutige Identifizierung.

Als Ausgangspunkt zur Identifizierung wurde die Position des Mononukleotides T_dp gesucht. Chromatografischer Vergleich

auf Papier und Kieselgel mit synthetischem Material (aus 2 wurde die β-Cyanoäthylschutzgruppe entfernt) zeigte, dass die Verbindung in Spitze 5 identisch mit T_dp war. Die Substanzen in den Spitzen 10, 13, 16, 19 wurden auf die gleiche Weise mit den entsprechenden synthetischen Oligonukleotiden 16, 17, 18, 19 verglichen. Die Nukleotide erwiesen sich in jedem Fall als identisch und bildeten zwei gleiche homologe Reihen.

Die Spitzen 21, 22 und 23 enthielten noch geringe Mengen nukleotidischen Materials, das auf Papier und Kieselgel kleinere Rf-Werte besass als das Pentanukleotid 19. Möglicherweise handelte es sich um das Hexa-, Hepta- und Octanukleotid. Für einen genaueren Nachweis waren die Mengen (1 bis 0,5 mg) jedoch zu gering.

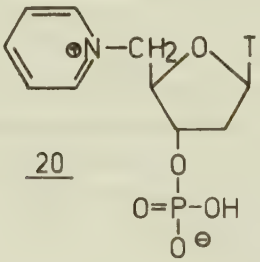
Der Abbau mit Monophosphatase erbrachte den endgültigen Beweis für die vorgenommenen Zuordnungen. Sämtliche Nukleotide wurden entphosphoryliert. Die Produkte bildeten auf Kieselgel eine homologe Reihe, die mit der synthetisch hergestellten Reihe der Nukleotide 12, 13, 14, 15 identisch war. Das Spaltprodukt aus Spitze 5 bestand ausschliesslich aus Thymidin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst:

Tabelle 3

Spitze	Substanz	Ausbeute in % $O.D._{267}$ 6)
5	T_dp	17
10	$d(Tp)_2$	7,6
13	$d(Tp)_3$	3,0
16	$d(Tp)_4$	1,6
19	$d(Tp)_5$	0,8

6) Die Anzahl der "Optical Density"-Einheiten (O.D.) ist das Produkt aus dem totalen Volumen der Lösung in ml und ihrer optischen Dichte, gemessen in einer 1cm-Zelle bei der angegebenen Wellenlänge.

Die geringen Ausbeuten an linearen Oligonukleotiden veranlassten uns, auch Spitze 1, in der 38 % des nukleotidischen Materials vorhanden waren, genauer zu untersuchen. Das Gemisch liess sich auf Papier in 2 Anteile mit Rf 0,18 und 0,05 (T_dp System F Rf 0,12) zerlegen. Dabei machte die unpolarere Substanz ein Fünftel, die polarere vier Fünftel der Gesamtmenge aus. Das UV.-Spektrum der polareren Verbindung zeigte ein Maximum bei 261 nm und eine starke Schulter bei 265 nm. Das entspricht einem äquimolaren Gemisch von Thymidin und einem Pyridiniumkation [22]. Nach Inkubation mit Monophosphatase wurde ein Nukleosid mit den gleichen UV.-Eigenschaften freigesetzt. Dieses Verhalten entspricht dem 5'- C-Pyridiniumnukleotid 20, das Khorana bei allen Polykondensationen fand, allerdings in prozentual geringerer Menge [20, 21, 22]. Der polarere Anteil liess sich bis jetzt noch nicht



20

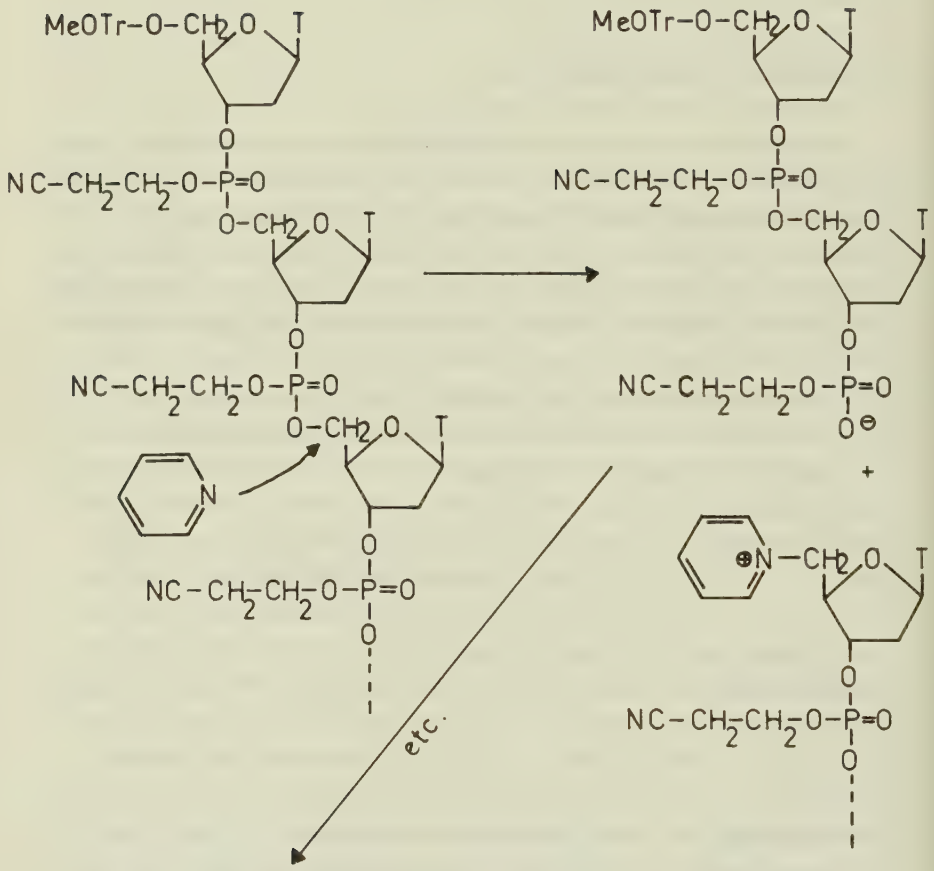
bestimmen. Seine Eigenschaften stimmen nicht mit einer der bei den bisherigen Polykondensationen gefundenen Substanzen überein. Das Hauptmaximum im UV.-Spektrum erschien bei 263 nm. Inkubation mit Monophosphatase und Reaktion mit 0,1N HCl bei 100° verursachten keine Veränderung. Nach Reaktion mit 1N NaOH während 15 Min. bei 100° konnte kein UV.-aktives Material mehr nachgewiesen werden. Mit 1N HCl bildete sich nach zwei Tagen ein UV.-aktives Produkt, welches in der Polarität zwischen Edukt und Thymidin lag.

Ein 3'-5'-cyclisches Monophosphat, das sonst bei Poly-

kondensationen auftritt, konnte nicht gefunden werden.

6. Diskussion der Ergebnisse

Die Auswertung des obigen Versuchs zeigt eindeutig, dass die Polykondensation zu Triestern bei Verwendung der klassischen Methode schlecht verläuft. Während Khorana bei der Polykondensation von pT_d [22] noch 41 % O.D. des nukleotidischen Materials als Polynukleotide, die grösser als das Tetranukleotid waren, isolieren konnte, erhielten wir lediglich noch sicher nachweisbar das Pentanukleotid in 0,8 % O.D. Ausbeute. Der Grund hierfür kann nicht nur in der Reaktionsträgheit der Diester liegen, da nur noch 17 % des Ausgangsmaterials zurückgewonnen werden konnten. Ausserdem beweisen die Arbeiten von Letsinger et al., dass diese Reaktionen im Gegenteil bemerkenswert sauber und quantitativ verlaufen können. Einen Hinweis für den Grund des Versagens der Methode bei unserem Substrat gab die Entstehung der grossen Mengen des 5'-C-Pyridiniumnukleotides 20. Khorana stellte bei einer genaueren Untersuchung der schrittweisen Synthese [45, 48] die Bildung dieser Substanz ebenfalls fest. Als möglichen Entstehungsmechanismus beschreibt er eine Reaktion zwischen dem Lösungsmittel Pyridin und einem Phosphorsäuretriester, der als Zwischenprodukt bei der Synthese entstehen kann. Pyridin greift aus sterischen Gründen am C-5' des Zuckers an und ergibt so das Nukleotid 20. Eine analoge Reaktionsfolge lässt sich für die Produkte formulieren, die bei der Triesterpolykondensation entstehen:



Es ist deutlich zu sehen, dass bei der Spaltung T_dp und 5'-C-Pyridinium-T_dp in einem Verhältnis entstehen, das nur durch die Kettenlänge bestimmt ist. In diese Theorie fügt sich ebenfalls die zurückbleibende Menge Mononukleotid, die durch Zugabe von TPS nicht verringert werden konnte. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist es unmöglich, diese

Reaktion auszuschalten. Die Triester sind schwer aktivierbar und erfordern dementsprechend längere Reaktionszeiten. Die Kettenspaltungsreaktion kann während dieser Zeit, auch wenn sie sehr langsam ist, ein grosses Ausmass erreichen.Es ist unter Umständen auch möglich, dass höhere 5'-C-Pyridiniumnukleotide im Gemisch vorhanden sind, wie sie Khorana bei der Polykondensation von T_dp fand [20]. An dieser Stelle lässt sich mit Bestimmtheit sagen, dass es unvorteilhaft ist, die Polykondensation zu Triestern auf die klassische Weise durchzuführen. Sie bietet in keiner Weise einen Vorteil gegenüber den bisherigen Methoden. Allerdings dürfte es möglich sein, bessere Resultate durch Verwendung eines weniger reaktiven Lösungsmittels zu erzielen. Pyridin wäre dann nur noch als Puffer für die entstehende Sulfonsäure nötig, und eine Spaltung der entstandenen Phosphorsäuretriesterbindungen nach dem erwähnten Mechanismus wäre nicht mehr möglich.

B. Experimenteller Teil

I. Allgemeines

Spektren und Diagramme wurden mit folgenden Geräten aufgenommen:

UV.-Elutionsdiagramme bei 254 nm mit dem "Uvicord" Typ LKB 4701 A.

UV.-Spektren mit einem Beckman UV.-Spektrophotometer, Modell DK 2.

IR.- Spektren mit einem Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125.

60 MHz-NMR.-Spektren mit einem Varian A-60-Spektrometer.

Alle Spektren wurden im Spektrallaboratorium des Instituts (K. Aegerter) aufgenommen.

Proben zur Elementaranalyse wurden bei Zimmertemperatur und 0,02 Torr 14 Std. getrocknet.

Die Analysen führte das mikroanalytische Labor des Instituts (E. Thommen) durch.

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert.

Zur Chromatografie kamen folgende Materialien zur Anwendung:

Zur Säulenchromatografie Kieselgel der Firma E. Merck A.G., Darmstadt (Korngrösse 0,05 - 0,20 mm).

Zur Cellulose-Ionenaustauscherchromatografie Cellulose von Serva, Entwicklungslabor Heidelberg, TYPE: DEAE-SS.

Bei der analytischen Papierchromatografie wurde Whatman No$\frac{1}{}$, bei der präparativen Papierchromatografie Whatman No$\frac{3}{}$ verwendet.

Die Dünnschichtchromatografie (DC) erfolgte auf Fertigplatten der Firma E. Merck A.G., Kieselgel F_{254}, Schichtdicke 0,25 mm.

Die Fliessmittelsysteme waren:

A Methylenchlorid-Methanol (9:1)

B Isopropanol-0,1 M wässerige Ammoniumhydrogenkarbonatlösung (9:1)

C Aceton mit 15 % Methanol und 4 % wässeriger Ammoniumhydrogenkarbonatlösung (0,1 M).

D Isopropanol- konz. Ammoniak-Wasser-(7:1:2)

E n-Propanol- konz. Ammoniak-Wasser-(55:10:35)

F Aethanol-1 M wässerige Ammoniumacetatlösung-(5:2)

Das verwendete Pyridin (Fluka A.G., Buchs St.G.) wurde über Molekularsieb 4 Å (Union Carbide) mindestens 4 Wochen aufbewahrt.
Lösungen wurden im Rotationsverdampfer bei 37° und 12 - 15 Torr eingedampft.

Die Trocknung der Substanzen zur Synthese erfolgte durch mehrfache Kodestillation mit abs. Pyridin und Abdampfen zur Trockne am Hochvakuum. Ammoniumhydrogenkarbonat wurde durch mehrfaches Eindampfen mit wässerigem Aethanol entfernt.

Wo nicht anders erwähnt, wurden die Ammoniumsalze der Nukleotide eingesetzt.

II. Beschreibung der Versuche

1. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin [$(MeOTr)T_d$]

Nach dem bekannten Verfahren [17] wurden 20 mM Rohprodukt hergestellt. Das resultierende zähe Oel wurde in einem Gemisch aus 200 ml Wasser und 200 ml Chloroform aufgenommen. Die Chloroformphase wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und unter Zusatz von 1 ml Pyridin eingedampft. Der

Rückstand musste mehrere Male mit Benzol eingeengt werden, bis der Geruch nach Pyridin verschwand. Der zähe Schaum löste sich in 150 ml Benzol nach Zugabe von 3 ml Methanol. Die Fällung erfolgte mit 170 ml Cyclohexan, das während 20 Std. aus einer feinen Kapillare unter starkem Rühren zugetropft wurde. Dabei kristallisierte das Produkt in feinen Nadeln und Nadelbüscheln. Ausbeute 9,4 g = 94 %. Smp. 115 - 118° (Lit. [52] 103 - 105°; [53] 115 - 117°). Rf System A 0,33. Sichtbar im UV., Braunfärbung mit Jod, Gelbfärbung mit 10 % $HClO_4$ in Wasser.

UV.-Spektrum in Aethanol: Maxima bei 195,5 (4,96); 231 (4,138) und 266 (4.008) nm (log ε).

IR-Spektrum (Methylenchlorid) (vgl. Fig. 1): Banden bei 3590 cm^{-1} (OH, Zucker); 3400 cm^{-1} (NH); 1700 cm^{-1} (sec. Amid); 1680 cm^{-1} (tert. Amid); 1600 und 1500 cm^{-1} (Aromat).

60 MHz-NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 2): Singulett bei 1,49 ppm (3H an C-5-CH_3), Triplett bei 2,22 ppm (2H an C-2', J = 5 Hz), Multiplett bei 3,28 ppm (2H anC-5'), Singulett bei 3,72 ppm (3H an Ar-O-CH_3), Multiplett bei 3,91 ppm (1H an C-4'), Multiplett bei 4,33 ppm (1H an C-3'), Dublett bei 5,29 ppm, entfällt bei Austausch mit D_2O (OH an C-3'), Triplett bei 6,20 ppm (1H an C-1', J = 6 Hz), Multiplett bei 6,75 - 7.60 ppm (15H an C-6 und Aromat), Singulett bei 11,30 ppm, entfällt bei Austausch mit D_2O (breit, 1H an Thymidin-N). Analyse:

$C_{30}H_{30}N_2O_6$ (514,59) Ber. C 70,02 H 6,09 N 5,44 %
Gef. C 70,29 H 5,88 N 5,41 %

2. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-O-β-cyanoäthylphosphat [(MeOTr)T_dp-(CNEt)]

β-Cyanoäthylphosphorsäure

650 mg Ba-Salz wurden in 8 ml Wasser unter Zugabe von 4 g Dowex 50 H^+ gelöst und durch eine kleine Säule (ca 2 g) Dowex 50 H^+ gegeben. Nach Spülen mit 8 ml Wasser wurde das Eluat mit 5 ml Pyridin eingeengt. Zum Trocknen des farblosen

Oels wurde noch 3-mal mit 10 ml abs. Pyridin eingedampft. Aufbewahrung bei + 2°.

2.1. Herstellung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)

Die Reaktion wurde analog Khorana [17] durchgeführt. Die vom Dicyclohexylharnstoff abfiltrierte Lösung wurde eingeengt, dann in Methylenchlorid-Methanol-(99:1) aufgenommen und mit 3-mal 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die eingedampfte Methylenchloridphase wurde in Wasser gelöst und mit 3-mal 20 ml Essigester ausgeschüttelt. Die wässerige Phase wurde eingedampft, der Rückstand in 30 ml Methylenchlorid gelöst und mit etwa 300 ml abs. Aether versetzt. Dabei fiel ein weisses Pulver aus, das abzentrifugiert und mit Aether gewaschen wurde. Ausbeute: 3,35 g = 80 %.

120 mg des Rohproduktes wurden 2-mal an Dickschicht chromatografiert. Platten: 20 x 20 cm; 1 mm dick. Adsorbens: Kieselgel E. Merck A.G., Darmstadt, für Dickschicht. Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(4:1). Die im UV. stark absorbierende Zone zwischen Rf 0,2 und 0,35 wurde mit 3-mal 20 ml Methanol eluiert, eingedampft, in Methylenchlorid aufgenommen, filtriert und mit abs. Aether gefällt. Ausbeute: 67 mg Pyridiniumsalz vom Smp. 178 - 182° (Lit. [54]: 180 - 182°). Analyse:

$C_{38}H_{39}N_4O_9P$ (726,27) Ber. C 62,80 H 5,41 %
Gef. C 58,05 H 5,33 %

2.2. Herstellung mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS)

Aus 850 mg Ba-β-Cyanoäthylphosphat wurde nach dem beschriebenen Verfahren eine trockene Lösung (3 ml) des Pyridiniumsalzes hergestellt. 1,08 g (2,1 mM) $(MeOTr)T_d$ wurden getrocknet und der entstandene feste, farblose Schaum mit der obigen Lösung von Pyridinium-β-cyanoäthylphosphat und einer Lösung von 1,5 g (4 mM) TPS in 3 ml Pyridin versetzt. Das Gemisch färbte sich dabei schwach gelb. Nach 14 Std. wurden 12 ml Wasser zugegeben, wobei anfangs eine milchige Trübung

entstand. Nach weiteren 4 Std. wurde 3-mal mit je 20 ml Chloroform extrahiert, die Chloroformlösung mit Wasser gewaschen und mit etwas Pyridin eingedampft.

Die Säulenchromatografie

Das Rohprodukt wurde auf eine 200 g Kieselgelsäule gegeben, die mit Aceton-Methanol-0,1M Ammoniumhydrogencarbonatlösung-(94,5:4:1,5) vorequilibriert war. Eluiert wurde mit steigenden Anteilen Methanol und NH_4HCO_3-Lösung (vgl. Fig. 3). Die Fraktionen 22 - 27 wurden vereinigt und durch Eindampfen von NH_4HCO_3 befreit. Der glasige Rückstand wurde in möglichst wenig Chloroform gelöst und durch vorsichtiges Tropfen in Aether als weisses Pulver gefällt. Ausbeute: 1,52 g = 76 %.

Das Produkt war in Systemen B Rf 0,30 und C Rf 0,26 einheitlich. Es war sichtbar im UV., färbte mit Jod langsam braun und ergab einen gelben Fleck mit 10-proz. $HClO_4$.

2.3. Isolierung als Cyclohexylammoniumsalz

20 g Dowex 50 H^+ wurden mit Methanol gewaschen und anschliessend mit 7 ml Cyclohexylamin in Methanol durchgespült, bis das Eluat basisch reagierte. Dann wurde die Säule neutral gewaschen. 52 mg Pyridiniumsalz aus 2.2. wurden in 3 ml Methanol gelöst und langsam mit dem gleichen Lösungsmittel durch die Säule gespült. Nach dem Eindampfen des Eluats wurde die Verbindung auf einer Dickschichtplatte mit Methylenchlorid-Methanol-(17:3) abgetrennt. Die stark UV.-absorbierende Zone zwischen Rf 0,15 und 0,3 wurde mit 3-mal 20 ml Methanol eluiert und aus Methylenchlorid mit einem Ueberschuss abs. Aether als weisse Flocken gefällt. Ausbeute: 27 mg Cyclohexylammoniumsalz; keine Kristallisation.

2.4. Isolierung als Bariumsalz

30 g Dowex 50 H^+ wurden mit einer 10-proz. Bariumchlorid-Lösung gewaschen, bis sich im Eluat Ba-Ionen nachweisen liessen. 35 mg Pyridiniumsalz aus 2.2. wurden in 1,5 ml Wasser gelöst und durch die Säule gespült, bis das Eluat Ba-frei war. Nach dem Eindampfen resultierten 30 mg eines Lacks, der sich aus heissem Aethanol zu einem weissen Pulver umfällen liess. Smp.: 198 - 206°, aber nach DC ein Gemisch aus 2 Substanzen.

Charakterisierung des NH_4-Salzes

UV.-Spektrum in Aethanol: Maxima bei 196 (4,97); 230 (4,25); 267 (4.015) nm (log ε).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 4): Banden bei 2260 cm^{-1} (C≡N), 1680 cm^{-1} (Amid), 1600 und 1500 cm^{-1} (Aromat), 1220 cm^{-1} (P=O), 1012 cm^{-1} (P-O-C).

60 MHz-NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 5): Singulett bei 1,41 ppm (3H, CH_3 an C-5), Multiplett bei 2,50 ppm (2H an C-2'), Triplett bei 2,72 ppm (2H an CH_2-CN, J = 6 Hz), Gegend von 3,0 bis 3,65 ppm enthält Wasser, H an C-5' und H an P-O-CH_2-, Singulett bei 3,78 ppm (3H an CH_3-O-Ar), Multiplett bei 4,21 ppm (1H an C-4'), Multiplett bei 4,88 ppm (1H an C-3'), breites Triplett bei 6,29 ppm (1H an C-1'), Multiplett bei 6,80 bis 7,55 ppm (15H an Aromat und C-6), Singulett bei 11,54 ppm, entfällt bei Austausch mit D_2O (1H an Thymidin-N).

3. Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat [T_dp-(CNEt)]

Die Abspaltung und Isolierung wurde analog [17] durchgeführt. Das Produkt entstand in 98-proz. Ausbeute als weisses Pulver. Wegen eines Startfleckes im DC wurde eine Filtration über 10 g Kieselgel, welches 3-mal mit heissem Methanol gewaschen worden war, ausgeführt. Das Pulver wurde in Methylen-

chlorid-Methanol-(4:1) gelöst, durch die Säule filtriert und nach Einengen aus wässerigem Aethanol mit einem Ueberschuss Aceton gefällt. Reines T_dp-(CNEt) 1/2 Ba·H_2O konnte in einer Ausbeute von 92 % erhalten werden. Smp.: 224 - 228° (Zersetzung). In der Schmelze entstanden Nadeln, die bei 250° schmolzen. Dann war der Schmelzfluss klar. Dünnschichtchromatogramme in Systemen B und D ergaben 1 Fleck. Sichtbar im UV. Schwarzfärbung nach Besprühen mit 10 % $HClO_4$ in Wasser und Erhitzen auf 150 - 200°, Gelb- bis Blaufärbung nach Umsatz mit Chlor und o-Tolidin. Nach Abspalten der Phosphorsäureschutzgruppe mit konz. Ammoniak über Nacht war das Produkt widerstandsfähig gegen die 5'-Nukleotidase aus Crotalus adamenteus [31].

UV.-Spektrum in Wasser: Maxima bei 205 (3,99) und 266 (3,98) nm (log ε).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 6): u.a. Banden bei 2240 cm^{-1} (C≡N), 1680 cm^{-1} (Amid), 1220 cm^{-1} (P=O), 1050 cm^{-1} (P-O-C).

60 MHz-NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 7): Singulett bei 7,76 ppm (1H an C-6), Triplett bei 6,19 ppm (1H an C-1', J = 6 Hz), Multiplett bei 4,78 ppm (1H an C-3'), Gegend von 4,3 bis 3,0 ppm enthält die Signale von H an C-5', C-5' OH, P-O-CH_2- und Wasser, Triplett bei 2,82 ppm (2H an -CH_2-CN), J = 6 Hz), Multiplett bei 2,50 bis 2,08 ppm (2H an C-2'), Singulett bei 1,82 ppm (3H anCH_3 von C-5).

Analyse:

($C_{13}H_{17}N_3O_8P$) 1/2 Ba·H_2O	(460,89)	Ber. C 33,82	H 4,36 %
		Gef. C 33,22	H 4,10 %

Isolierung als NH_4-Salz

Auf die übliche Weise wurde mit Hilfe von Dowex 50 H^+ Kationenaustauscher aus dem Ba-Salz die Säure freigesetzt und unter Kühlen und Rühren das Eluat mit konz. Ammoniak vorsichtig

neutralisiert. Nach dem Eindampfen bildete das Salz einen harten, farblosen Lack, der sich weder fällen noch kristallisieren liess.

4. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'-(bis -β-cyanoäthyl)-phosphat [(MeOTr)T_dp-(CNEt)$_2$]

39,5 mg (0,05 mM) (MeOTr)T_dp-(CNEt) wurden mit 0,13 ml (1,92 mM) β-Hydroxypropionitril in 0,35 ml Pyridin unter Zusatz von 70 mg (0,22 mM)TPS bei 4° umgesetzt. Das Nukleotid war auf die übliche Weise getrocknet worden, β-Hydroxypropionitril wurde mehrere Wochen über Molekularsieb 4Å aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurden 2 ml Wasser zugegeben und nach 4 Std. mit Aether extrahiert. Der Aetherextrakt wurde auf 15 g Kieselgel mit Methylenchlorid und 0 -5 % Methanol getrennt. Der Triester erschien bei 3 % Methanol. Die Fraktionen wurden gesammelt, eingedampft und das Produkt aus Benzol-Cyclohexan gefällt. Es resultierten 19,7 mg einer weissen, kristallartigen Substanz vom Smp. 70 - 74°. Ausbeute: 63 %.

Das UV.-Spektrum zeigte ein Maximum bei 266 nm wie Thymidin und eine Schulter bei 224 nm. Auf Dünnschicht liess sich mit 10-proz. Perchlorsäure die Tritylgruppe durch Gelbfärbung nachweisen. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen ist die Substanz identisch mit T_dp.

5. 5'-O-Monomethoxytritylthymidylylthymidin [(MeOTr)T_dpT_d]4

Hydrolyse von (MeOTr)T_dp$T_d$ac

500 mg (MeOTr)T_dp$T_d$ac wurden in 10 ml 50-proz. Pyridin gelöst und mit 20 ml konz. Ammoniak 5 Std. auf 60° erhitzt. Vor dem Eindampfen wurden 100 mg Ammoniumhydrogencarbonat in 10 ml Wasser zugegeben und während des Einengens 2-mal 1 ml Pyridin zugesetzt. Der Rückstand wurde 3-mal mit Wasser einge-

dampft, in Pyridin aufgenommen und unter starkem Rühren in abs. Aether getropft. Eine schwach bräunliche Substanz fiel aus, wurde abzentrifugiert, 3-mal mit Aether gewaschen und am Vakuum getrocknet. Ausbeute: 430 mg = 93 %. Rf auf DC in System D 0,70. Es war eine schneller und eine langsamer laufende Verunreinigung zu erkennen, die bereits im Ausgangsmaterial vorhanden waren. Zur Charakterisierung des Dinkleotides siehe 10.

Tritylierung von T_dpT_d [17]

Die Reaktion wurde nach Literatur ausgeführt. Die Reinigung erfolgte auf Papier Whatman No 3 in System D.

Es resultierten 120 mg geschütztes Dinukleotid in einer Ausbeute von 52 %.

6. 3'-O-Acetylthymdidin-5'-phosphat (pT_dac)

Die Acetylierung von pT mit Essigsäureanhydrid erfolgte nach Türler [53]. Das Rohprodukt (2,5 g) wurde in 4 ml abs. Pyridin gelöst und durch vorsichtiges Tropfen in 400 ml trockenen Aether gefällt. Nach 1 Std. Stehenlassen bei 4° konnte abzentrifugiert und 4-mal mit abs. Aether gewaschen werden. Ausbeute: 2,3 g.

Das Produkt enthielt eine geringe Menge einer auf DC (System D) und Papier (System E) schneller laufenden Verunreinigung.

UV.-Spektrum: Hauptmaximum bei 266 nm. Inkubation mit Monophosphatase nach Abspaltung der Acetylgruppe durch konz. Ammoniak lieferte als einziges Produkt Thymidin.

7. Das 5'-O-Monomethoxytritylthymidintrinukleotid (d[(MeOTr)TpTpT]) 5

Der Umsatz erfolgte analog Khorana [48]. 320 mg (0,3 mM) (d[(MeOTr)TpT]) und 354 mg (0,8 mM) pT_dac wurden nach dem Stan-

dardverfahren getrocknet und unter strengstem Feuchtigkeitsausschluss mit 523 mg Mesitylensulfonylchlorid (MS) gemischt. Das Gemisch wurde in 4 ml Pyridin gelöst und 16 Std. bei 22° umgesetzt, bis mit 3,5 ml Wasser hydrolysiert und nach weiteren 5 Std. unter Zusatz von Ammoniumhydrogenkarbonat eingedampft wurde. (Während des Eindampfens wurde 2-mal 1 ml Pyridin zugegeben). Die zurückbleibende zähe Masse löste sich in konz. Ammoniak und wurde nach 16 Std. unter Zugabe von 50 mg Ammoniumhydrogenkarbonat auf ein kleines Volumen eingeengt. Die gesamte Lösung wurde auf eine DEAE-Cellulosesäule (34 x 4 cm) in Karbonatform aufgetragen und mit etwa 100 ml Wasser eingewaschen. Die Säule wurde nach Türler [53] vorbereitet und mit einem linearen Hydrogenkarbonatgradient eluiert, der durch 2 kommunizierende Gefässe erzeugt wurde.

Mischgefäss:	2,5 l	0,01 M	Ammoniumhydrogenkarbonat	in	10 %	Aethanol
Vorratsgefäss:	2,5 l	0,25 "	"	"	20 %	Aethanol
anschliessend						
Mischgefäss:	1,5 l	0,25 "	"	"	"	"
Vorratsgefäss:	1,5 l	0,4 "	"	"	"	"

Durchflussgeschwindigkeit: 0,5 - 1,2 ml/Minute
Fraktionengrösse: 15 ml.
Tritylhaltige Fraktionen konnten wie folgt bestimmt werden: Etwa 0,5 ml einer Fraktion wurden auf ein kleines Filterpapier aufgetragen, mit 10-proz. Perchlorsäure besprüht und im warmen Luftstrom getrocknet. Tritylgruppen zeigten sich durch Gelbfärbung des Filterpapiers.

Das gesuchte Trinukleotid 5 befand sich in Fraktionen 182 - 260 (vgl. Fig. 8). Es wurde durch wiederholtes Eindampfen mit wässerigem Aethanol und Lyophilisieren vom Ammoniumhydrogenkarbonat befreit. Dabei resultierten 276 mg als weisses Pulver. Ausbeute: 68 %. Das Produkt war auf DC in System D (Rf: 0,48) einheitlich.

UV.-Spektrum in Wasser: ε_{266} = 25'600 (Lit. 25'800 [48]).

Nach Abspaltung der Schutzgruppe mit 80-proz. Essigsäure wurden 0,5 mg des Nukleotids mit Schlangengiftphosphodiesterase vollständig zu pT_d und T_d im Verhältnis 1,88 zu 1 (theoretisch 2:1) gespalten.

8. Das 5'-O-Monomethoxytritylthymidintetranukleotid d[(MeOTr)TpTpTpT] 6

270 mg (0,25 mM) Trinukleotid 5 wurden nach dem Standardverfahren getrocknet und mit einer Lösung von 553 mg (1,25 mM) pT_dac und 546 mg (2,5 mM) MS in 3,5 ml Pyridin vermischt, die bereits 10 Min. reagiert hatte. Reaktionszeit und Hydrolysenbedingungen waren identisch mit denen des Trinukleotids. Die Auftrennung erfolgte nach dem Standardverfahren an DEAE-Cellulose (34 x 4 cm).

Mischgefäss:	3 l	0,01 M	Ammoniumhydrogenkarbonat	in	10 % Aethanol
Vorratsgefäss:	3 l	0,35 "	"	"	20 % "
anschliessend					
Mischgefäss:	1 l	0,35 "	"	"	" "
Vorratsgefäss:	1 l	0,5 "	"	"	" "

Tritylteste und Isolierungen erfolgten nach den Standardverfahren.

Das Tetranukleotid 6 war in den Fraktionen 225 - 260 (leicht verunreinigt) und 261 - 350 (rein). (vgl. Fig. 9).

Nach Lyophilisieren resultierten 190 mg des Tetranukleotides als weisses Pulver. Ausbeute: 55 %.

Das Präparat war einheitlich auf DC in System D, Rf: 0,39. Im UV. und bei Entwicklung mit 10-proz. Perchlorsäure was das Produkt einheitlich.

UV.-Spektrum in Wasser: ε_{266} = 32'600 (Lit.: 34'000 [48]).

Nach Abspaltung der Tritylgruppe wurden etwa 0,5 mg mit Schlangengiftphosphodiesterase vollständig zu pT_d und T_d im

Verhältnis 2,7 zu 1 (theoretisch 3:1) gespalten.

9. Das 5'-O-Monomethoxytritylthymidinpentanukleotid 7

d[(MeOTr)TpTpTpTpT]

300 mg (0,67 mM) pT_dac wurden getrocknet und mit einer Lösung von 445 mg (2,03 mM) MS in 2ml Pyridin versetzt. Nach 5 Min. wurde dieses Gemisch zu 100 mg (0,067 mM) Tetranukleotid 6 gegeben. Reaktion und Aufarbeitung erfolgten analog dem Tetranukleotid.

Die Trennung fand nach dem Standardverfahren an DEAE-Cellulose (40 x 4 cm) statt. (vgl.Fig. 10).

Mischgefäss:	3 l	0,01 M	Ammoniumhydrogenkarbonat	in	10 %	Aethanol
Vorratsgefäss:	3 l	0,3 "	"	"	20 %	"
anschliessend						
Mischgefäss:	1,5 l	0,3 M	"	"	"	"
Vorratsgefäss:	1,5 l	0,5 "	"	"	"	"

Tritylteste und Isolierung der Verbindungen erfolgten nach dem Standardverfahren.

Das Pentanukleotid 7 konnte aus den Fraktionen 474 - 513 isoliert werden. Nach Lyophilisieren ergaben sich 70,0 mg als weisses Pulver. Ausbeute: 57 %.

Die Substanz zeigte auf DC in System D, im UV. und nach Besprühen mit 10-proz. Perchlorsäure und Erhitzen einen Fleck mit Rf: 0,31.

UV.-Spektrum in Wasser: ε_{266} = 40'500 (Lit. 42'500 [48]).

Bei Inkubation mit Schlangengiftphosphodiesterase nach der Abspaltung der Tritylschutzgruppe wurde das Nukleotid vollständig zu pT_d und T_d gespalten. Die Bestimmung des Verhältnisses (etwa 3,1) wurde durch eine Unreinheit verhindert (vgl. Theoret. Teil).

10. Die Phosphorylierungen

Stammlösung

Nach 2. wurde eine Standardlösung des Pyridiniumsalzes der β-Cyanoäthylphosphorsäure mit der Konzentration 0,5 mM/ml Pyridin hergestellt. Die farblose, klare Lösung wurde bei 2° aufbewahrt.

Die Phosphorylierung des geschützten Dinukleotides 4

105 mg (0,11 mM) Dinukleotid 4 wurden mit 0,44 ml (0,22 mM) Stammlösung nach dem bekannten Verfahren getrocknet. Anschliessend wurden unter strengstem Feuchtigkeitsausschluss nacheinander 240 mg (0,8 mM) TPS und 3 ml abs. Pyridin zugegeben. Nach 20Std. Reaktion bei 2° wurde mit 3 ml Wasser unter Eiskühlung 5 Std. hydrolysiert. Durch Zugabe von 20 ml konz. Ammoniak entstand eine klare gelbe Lösung, die nach 18 Std. unter den üblichen Vorsichtsmassnahmen eingedampft wurde. Das gesamte Gemisch konnte nach Lösen in Wasser auf eine DEAE-Cellulosesäule aufgetragen und mit Wasser eingewaschen werden. (Die Lösungen schäumen beim Eindampfen sehr stark. Durch Zusatz von Aethanol kann dies jedoch weitgehend verhindert werden).
Elutionsgradient:

Mischgefäss:	2 l	0,03 M	Ammoniumhydrogenkarbonat		in 10 %	Aethanol
Vorratsgefäss:	2 l	0,2 "	"	"	20 %	Aethanol
anschliessend						
Mischgefäss:	2 l	0,2 "	"	"	"	"
Vorratsgefäss:	2 l	0,4 "	"	"	"	"

Fliessgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min.
Die Tritylgruppen wurden auf die übliche Art kenntlich gemacht. Die zwei Hauptspitzen zwischen Fraktionen 271 - 299 und Fraktionen 300 - 325 (vgl. Fig. 11) wurden gesammelt und die Produkte durch mehrmaliges Eindampfen mit Wasser und Lyophilisieren isoliert. Durch Dünnschichtchromatografie in Sy-

stem D konnte die Substanz in Fraktionen 271 - 299 als das nicht umgesetzte Dinukleotid identifiziert werden.

Das jetzt rein erhaltene Dinukleotid 4 wurde nach Abspaltung der Tritylgruppe mit Schlangengiftphosphodiesterase inkubiert. Der Abbau war vollständig und ergab ein Verhältnis $pT_d:T_d$ von 0,91 zu 1 (theoretisch 1:1).

Die Phosphorylierung konnte wie folgt bewiesen werden:

a) Das Produkt aus Fraktionen 300 - 325 wurde mit 80-proz. Essigsäure enttrityliert und mit Phosphomonoesterase inkubiert. Es trat vollständige Spaltung ein und das Produkt erwies sich nachDC als identisch mit dem Dinukleotid T_dpT_d.

b) Die Inkubation mit Milzphosphodiesterase ergab ein einziges Produkt, das identisch mit T_dp war.

Die Ausbeuten betrugen: d[(MeOTr)TpT] 20 %
d[(MeOTr)TpTp] 36 %

Die Phosphorylierung des geschützten Trinukleotides 5

40 mg (0,034 mM) Trinukleotid 5 und 0,2 ml (0,1 mM) Stammlösung wurden auf die übliche Weise zusammen getrocknet und mit 105 mg (0,34 mM) TPS in 1,2 ml abs. Pyridin versetzt. Nach 6Std. erfolgte die Zugabe von 1,2 ml Wasser und nach weiteren 6 Std. wurden 20 ml konz. Ammoniak zugegeben. Nach 18 Std. wurde unter den bekannten Vorsichtsmassnahmen eingeengt, in Wasser gelöst und an einer DEAE-Cellulosesäule (20 x 2,5 cm) nach demStandardverfahren chromatografiert.

Elutionsgradient:

Mischgefäss:	2 l	0,03 M	Ammoniumhydrogenkarbonat	in	10 %	Aethanol
Vorratsgefäss:	2 l	0,2 "	"	"	20 %	"
anschliessend						
Mischgefäss:	1 l	0,2 "	"	"	"	"
Vorratsgefäss:	1 l	0,4 "	"	"	"	"

Durchflussgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min.

Fraktionengrösse: etwa 12 ml
Tritylteste und Isolierung der Verbindungen wurden wie üblich durchgeführt.

Nach DC- Vergleich enthielten die Fraktionen 293 - 302 (vgl.Fig. 12) das Trinukleotid, dieFraktionen 322 - 339 das phosphorylierte Trinukleotid d[(MeOTr)$(Tp)_3$]. Ausbeute: 19 mg = 47 %.
Das Nukleotid war im Dünnschichtchromatogramm einheitlich in Systemen D und E mit Rf 0,12 und Rf 0,52.

Die Inkubation des enttritylierten Nukleotides mit Phosphomonoesterase lieferte ein einziges Produkt, das mit dem synthetischen Trinukleotid d(TpTpT) identisch war.

Bei Inkubation mit Milzphosphodiesterase entstand ein einziges Produkt, identisch mit synthetischem Thymidin3'-phosphat.

Die Phosphorylierung des geschützten Tetranukleotids 6

50 mg (0,034 mM) Tetranukleotid 6 und 0,27 ml (0,13 mM) Stammlösung wurden getrocknet und mit 154 mg (0,51 mM) TPS in 1,3 ml abs. Pyridin versetzt. Nach 6 Std. fand Hydrolyse mit 1,3 ml Wasser statt. Nach weiteren 12 Std. wurden 40 ml konz. Ammoniak zugegeben und die Lösung 48 Std. bei 4° stehengelassen. Die weitere Aufarbeitung und das Beladen der Säule erfolgten nach den Standardverfahren.
Elutionsgradient:

Mischgefäss:	2 l	0,01 M	Ammoniumhydrogenkarbonat	in	
Vorratsgefäss:	2 l	0,3 "	"	"	$\frac{10}{20}$ % Aethanol "

anschliessend

Mischgefäss:	1 l	0,3 "	"	"	" "
Vorratsgefäss:	1 l	0, 45 M	"	"	" "

Tritylteste und Isolierung der Fraktionen erfolgten nach den Standardverfahren.
Durch DC-Vergleich liessen sich aus den Fraktionen 168 - 186 60 O.D. Ausgangsmaterial auf die übliche Weise isolieren. Die

Fraktionen 283 - 297 (vgl.Fig. 13) enthielten 176 O. D. des gesuchten phosphorylierten Tetranukleotides 10. Das Produkt ergab einen einzigen Fleck auf DC in System D (Rf 0,44). Nach der Enttritylierung lieferte die Inkubation mit Phosphomonoesterase ein einziges Produkt, das identisch mit dem synthetischen Tetranukleotid d(TpTpTpT) war. Inkubation mit Milzphosphodiesterase bildete als einziges Produkt T_dp.

Die Verbindung in Fraktionen 235 - 260 (360 O.D.) war auf DC in System D etwas polarer als das Tetranukleotid 6. Sie wurde in 40 ml konz. Ammoniak aufgenommen und 30 Min. auf 60° erwärmt. Es entstand ein polareres Produkt, das mit dem phosphorylierten Tetranukleotid 10 identisch war. Nach Eindampfen der Lösung wurden 10 ml 80-proz. Essigsäure zugesetzt und 10 Min. auf 100° erhitzt. Die blassgelbe Lösung wurde dann wieder eingeengt, in Wasser aufgenommen, filtriert und nach Eindampfen auf ein kleines Volumen lyophilisiert. Ausbeute: 16,3 mg $d(Tp)_4$ 18. Das Präparat war dünnschicht- und papierchromatografisch einheitlich und identisch mit dem enttritylierten Tetranukleotid 10.

Die Phosphorylierung des Pentanukleotides 7

40 mg (0,019 mM) Pentanukleotid 7 wurden mit 0,19 ml (0,094 mM) Stammlösung versetzt und nach den üblichen Trocknungsverfahren mit 84 mg (0,28 mM) TPS in 0,7 ml Pyridin zur Reaktion gebracht. Nach 7 Std. wurde mit 0,7 ml Wasser unter Eiskühlung hydrolysiert und 18 Std. stehengelassen. Nach 6 Std. Reaktion mit 10 ml konz. Ammoniak wurde 10 Min. auf 60° erhitzt, wie üblich eingedampft und auf eine DEAE-Cellulosesäule (20 x 2,5 cm) aufgetragen.

Elutionsgradient:

Mischgefäss: 3 l 0,01 M Ammoniumhydrogenkarbonat in 10 % Aethanol

Vorratsgefäss: 3 l 0,3 " " " 20 % "

Durchflussgeschwindigkeit : 0,7 ml/Min.

Identifizierung und Isolierung der Produkte erfolgten nach den üblichen Methoden. Nach der Lyophilisation wurden aus den Fraktionen 267 - 283 (vgl. Fig. 14) 8 mg Ausgangssubstanz als weisses Pulver gewonnen. Die Fraktionen 300 - 317 enthielten 15,7 mg phosphoryliertes Pentanukleotid 11, das wie folgt bestimmt werden konnte:

Das Präparat war einheitlich auf DC in System E und fügte sich in die homologe Reihe der phosphorylierten Nukleotide.

Nach der Enttritylierung setzte die Monophosphatase als einziges Produkt das Pentanukleotid d(TpTpTpTpT) 15 frei.

Inkubation der Verbindung mit Milzphosphodiesterase ergab als einziges Produkt T_dp. Die Identifizierung der Spaltprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatografie.

11. Die Polykondensation von Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat

370 mg (0,5 mM) (MeOTr)T_dp-(CNEt) und 790 mg (1,5 mM) T_dp-(CNEt) wurden 4-mal mit 5 ml abs. Pyridin eingedampft und am Hochvakuum getrocknet, bis ein harter, trockener Schaum entstand (je etwa 20 Min.). In einem kleinen Kochglas wurde eine Lösung von 1,3 g (4 mM) TPS in 2,1 ml Pyridin vorbereitet. Die Zugabe dieser Lösung zum Nukleotidgemisch erfolgte mit einer Spritze, die durch Plastikdeckel gestossen wurde. Nach 4 Tagen war sämtliches TPS gelöst, nach 8 Tagen wurden nochmals 200 mg TPS zugegeben, die sich innerhalb weiterer 3 Tage lösten. Nach 12 Tagen wurden unter Eiskühlung vorsichtig 30 ml Wasser zugesetzt. Das Gemisch war anfangs milchig trüb, wurde dann aber klar. Nach 24 Std. wurde mit 100 ml 80-proz. Essigsäure 10 Min. auf 100° erhitzt und dann so lange mit Wasser eingeengt, bis kein Geruch nach Essigsäure mehr wahrnehmbar war. Der trockene Rückstand wurde in 50 ml konz. Ammoniak gelöst, über Nacht stehengelassen und dann 30 Min. auf 60° erwärmt. Es entstand eine trübe, orange-rote Lösung,

die eingedampft wurde. Nachdem der Rückstand in 2 gleiche Teile geteilt worden war, wurde ein Teil nochmals mit konz. Ammoniak 30 Min. auf 60° erwärmt und anschliessend eingeengt. Zum trokkenen Rückstand wurden 30 ml Wasser gegeben und soviel Aethanol, bis die gesamte Menge in Lösung gegangen war. Diese Lösung wurde auf eine DEAE-Cellulosesäule (61 x 4 cm) aufgetragen und mit 25-proz. wässerigem Aethanol eingespült. Die nicht anionischen Anteile wurden mit 1 l 25-proz. Aethanol aus der Säule ausgewaschen.

Elutionsgradient:

Mischgefäss: 3 l Wasser

Vorratsgefäss: 3 l 0,25 M Ammoniumhydrogenkarbonat-Lösung in Wasser

anschliessend

Mischgefäss: 3 l 0,25 M " " " "

Vorratsgefäss: 3 l 0,5 M " " " "

Der pH-Wert der Ammoniumhydrogenkarbonat-Lösung blieb konstant zwischen 8,5 und 9,0. Durchflussgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min. Alle 30 Min. wurden Fraktionen von 20 - 25 ml genommen. Folgende Fraktionen wurden gesammelt und auf die übliche Weise isoliert: (vgl. Fig. 15)

Fraktionen	Nr.	O.D.	% O.D.
59 - 83	1	2900	38
95 - 99	2	270	3,5
100 - 106	3	94	1,2
117 - 130	4	nicht nukleotidisch	
131 - 138	5	1300	17
139 - 146	6	550	7,2
147 - 159	7	355	4,6
162 - 172	8	340	4,4
174 - 185	9	194	2,5
195 - 214	10	560	7,6
223 - 231	11	94	1,2

Fraktionen	Nr.	O.D.	% O.D.
232 - 243	12	104	1,3
259 - 270	13	230	3,0
271 - 276	14	120	1,5
277 - 289	15	134	1,7
295 - 303	16	125	1,6
304 - 317	17	83	1,1
319 - 328	18	43	0,56
330 - 340	19	64	0,8
350 - 364	20	42	0,56
365 - 371	21	24	0,31
395 - 406	22	18	0,18
433 - 446	23	10	0,10

Je 2 O.D. sämtlicher Fraktionen wurden auf Dünnschicht aufgetragen und in den Systemen D und E mit den synthetisch hergestellten Polynukleotiden 16 bis 19 verglichen.

Nr. 1 - 8 in System D
Nr. 8 - 23 " " E

Alle Fraktionen waren zu etwa 5 % verunreinigt. Die Rf-Werte der Produkte in den Fraktionen mit Nummern 5, 10, 13, 16, 19 bildeten eine homologe Reihe, die identisch war mit der synthetisch hergestellten Reihe von $T_dp \longrightarrow d(Tp)_5$ (vgl. Kap. IV). Die Papierchromatografie der Fraktionen in System F ergab das gleiche Ergebnis. Aufgetragen wurden je 5 O.D., die Laufzeit der höheren Polymeren betrug 2 - 4 Tage.

Je 10 O.D. der Fraktionen 5, 10, 13, 16, 19 wurden mit Phosphomonoesterase auf die übliche Art inkubiert. In jedem Fall wurden die Nukleotide vollständig abgebaut zu einer auf Dünnschicht schneller laufenden Verbindung.

Je 10 µl der Inkubationslösungen wurden auf Dünnschicht aufgetragen und direkt mit den synthetisch hergestellten Nu-

kleotiden d(TpT), d(TpTpT), d(TpTpTpT) und d(TpTpTpTpT) in System D verglichen. Sie erwiesen sich als identisch. Fraktion 5 ergab Thymidin als UV.-aktives Spaltprodukt.

Fraktion 1 wurde auf Dünnschicht und Papier in 2 UV.-absorbierende Flecke geteilt. Relativ zu T_dp lief ein Produkt schneller und eines langsamer (vgl. Rf-Werte in IV.). Etwa 160 O.D. des Gemisches wurden als Band auf Papier Whatman No 3 aufgetragen und in System F entwickelt. Es entstanden 2 scharf voneinander getrennte, UV.-absorbierende Zonen mit den Rf-Werten 0,08 - 0,30 und 0,32 - 0,55. Die Zonen wurden ausgeschnitten, zerkleinert und 24 Std, mit Wasser eluiert. Die Messung der optischen Dichten zeigte folgendes Verhältnis: obere Zone 28 O.D., untere Zone 114 O.D.

Die Identifizierung der unteren Zone

UV.-Spektrum in Wasser: Hauptmaximum bei 261 nm; sehr starke Schulter bei 265 nm.

Inkubation von 10 O.D. mit Phosphomonoesterase bewirkte eine vollständige Spaltung in ein Nukleosid, das wesentlich polarer war als Thymidin.

UV.-Spektrum des Nukleosides in Wasser: Hauptmaximum bei 261 nm; sehr starke Schulter bei 265 nm.

Identifizierung der oberen Zone

UV.-Spektrum in Wasser: Hauptmaximum bei 263 nm.

Bei Inkubation von 10 O.D. mit Phosphomonoesterase trat keine Spaltung ein. Die Hydrolyse mit 0,1N HCl bei 100° bewirkte nach 15 Min. keine Veränderung. Nach 15 Min. Reaktion mit 1N NaOH bei 100° war im Dünnschichtchromatogramm kein UV.-absorbierendes Material mehr festzustellen. Nach Reaktion mit 1N HCl bei 23° trat nach 48 Std. ein UV.-aktives Produkt auf, das unpolarer als das Ausgangsmaterial war, aber polarer als Thymidin und Thymin.

III. Enzymatische Spaltungen

1. Spaltungen mit Kälberdarm-Phosphomonoesterase (Fluka A.G., Buchs St.G.)

Stammlösungen

1 M Glycin Puffer; pH 10 [55]

Zu 50 ml 2M Glycinlösung in Wasser wurden 32 ml 1 M NaOH gegeben und mit bidest. Wasser auf 100 ml verdünnt.

0,01 M $MgCl_2$-Lösung (E. MerckA.G., Darmstadt).

Enzymlösung

5 mg Enzym wurden in 1 ml bidest. Wasser suspendiert.

Substratlösungen

Je 3 mg der Nukleotide 4 bis 7 und 8 bis 11 wurden in Kochgläser eingewogen, mit je 1 ml 80-proz. Essigsäure versetzt und 10 Min. auf 100° erwärmt. Am Wasserstrahlvakuum wurde je 2-mal mit je 1 ml Wasser bei 50° zur Trockne eingedampft. Die Rückstände wurden je 2-mal mit je 2 ml Aether extrahiert, dann in 2 Portionen à 1 ml Wasser gelöst, durch Watte filtriert und eingeengt. Die lackartigen Präparate wurden in je 0,3 ml Wasser gelöst und bei 2° aufbewahrt. Sämtliche Produkte waren papierchromatografisch einheitlich (Whatman No 3; System E).

Bestimmung des optimalen Enzym/Substrat-Verhältnisses an der Spaltung von $d(Tp)_2$

Substrat	0,04 ml
Puffer	0,1 "
$MgCl_2$	0,1 "
Enzymlösung	0,05 "
bidest. Wasser	0,7 "
Inkubationszeit	5, 10, 15, 20, 25, 30 Min.

Die Spaltprodukte wurden auf Dünnschicht in System D kontrolliert. Nach 20 Min. Inkubation trat Phosphodiesteraseaktivität auf. Die besten Inkubationsbedingungen ergaben sich zu:

Nukleotid	0,4 mg
Puffer	0,1 ml
$MgCl_2$	0,1 ml
Enzymlösung	0,05 ml
bidest. Wasser	auf 1 ml verdünnen
Inkubationszeit	10 Min
Temperatur	37°

Alle Versuche mit Monophosphatase wurden nach diesem Muster durchgeführt.

2. Spaltungen mit Schlangengift-Phosphodiesterase
(Russel's Viper, lyophilized, B grade) CALBIOCHEM

Stammlösung des Enzyms [40]

150 E des Enzyms wurden in 0,75 ml 0,33 M TRIS-Puffer pH 9,1 [55] gelöst und bei 0° aufbewahrt.

Durchführung der Tests

Je 0,05 ml der Lösungen der Nukleotide 12 bis 15 und 0,5 mg pT_d wurden eingedampft und mit je 0,1 ml der Enzymlösung bei 37° versetzt. Die Inkubationszeiten waren:

pT_d	7 Std.
d(TpT)	3 "
d(TpTpT)	4 "
d(TpTpTpT)	4,5 "
d(TpTpTpTpT)	5 "

Geringe Mengen wurden auf Dünnschicht aufgetragen und in System D entwickelt. Es resultierte jeweils vollständige Zersetzung zu pT_d und T_d. pT_d blieb unverändert.

Bestimmung der Kettenlänge

Die Inkubationslösungen der Oligonukleotide 12 bis 15 wurden als 3 cm breites Band auf Papier Whatman No 3 aufgetragen und in SystemE entwickelt (14 Std.). Die im UV. stark absorbierenden Zonen mit Rf 0,45 (pT_d) und Rf 0,76 (T_d) wurden ausgeschnitten, zerkleinert und 14 Std. mit 5 ml 0,1N HCl eluiert. Es wurde direkt über Watte in 10 ml Messkölbchen filtriert und das Papier 2-mal mit 2 ml und 1-mal mit 1 ml 0,1 N HCl nachgewaschen. Blindproben, d.h. Papierstücke, die in gleicher Grösse auf gleicher Höhe vom selben Papier geschnitten wurden, erfuhren die gleiche Behandlung. Die Nukleotidlösungen wurden im UV.-Spektrophotometer gegen die Blindproben gemessen. Das Verhältnis der optischen Dichten der Nukleotid- und Nukleosidlösungen ergibt das molare Verhältnis $pT_d:T_d$.

3. Spaltungen mit Milzphosphodiesterase

(Phosphodiesterase II, Spleen Bovine. Nutritional Biochemicals Corporation)

Stammlösung

2,5 mg des Enzyms wurden in 0,5 ml eines 0,2 M NH_4OAc-Puffers pH 5,7 gelöst [56].

Die Durchführung der Versuche

Je 0,02 ml der Lösungen der Nukleotide 12 bis 15 und 16 bis 19 wurden eingedampft und mit je 0,04 ml Enzymlösung bei 37° 5 Std. inkubiert. Proben der Inkubationslösungen wurden auf Dünnschicht aufgetragen und in System E entwickelt. Die phosphorylierten Nukleotide wurden vollständig zu T_dp gespalten. Die nicht phosphorylierten Nukleotide wurden vollständig in T_dp und T_d zerlegt.

IV. Rf-Tabelle

Substanz	Dünnschicht System D	Dünnschicht E	Papier E	Papier F
(MeOTr)T_d	0,88			
(MeOTr)T_dp-(CNEt)	0,70			
T_dp-(CNEt)	0,48			
T_dp	0,12	0,41		1,0
pT_d	0,13		0,46	
p$T_d$ac	0,21			
(MeOTr)T_dp$T_d$ac	0,64			
T_dp$T_d$ac	0,66			
(MeOTr)T_dpT_d	0,70			
d(MeOTr)TpTpT)	0,45			
d(MeOTr)TpTpTpT)	0,38			
d(MeOTr)TpTpTpTpT)		0,56		
d(TpT)	0,51	0,53	0,63	
d(TpTpT)	0,30		0,59	
d(TpTpTpT)	0,18		0,53	
d(TpTpTpTpT)	0,12		0,51	
d(MeOTr)$(Tp)_2$	0,34			
d(MeOTr)TpTp-(CNEt)	0,50			
d(MeOTr)$(Tp)_3$	0,12			relativ
d(MeOTr)$(Tp)_4$		0,44		zu T_dp
d(MeOTr)$(Tp)_5$		0,36		
$d(Tp)_2$	0,07	0,42		0,46
$d(Tp)_3$		0,36		0,41 *)
$d(Tp)_4$		0,31		0,10
$d(Tp)_5$		0,30		0,06
5'-C Pyridinium-T_dp	0,05			0,83
Substanz in "oberer Zone"	0,18			1,53

*) Papier Schleicher und Schüll

C. Zusammenfassung

Mit Hilfe von synthetischen Polynukleotiden ist es möglich, Einblicke in die Mechanismen der Biosynthese der Proteine, der Wirkungsweise von Nukleinsäuren und Enzymen zu gewinnen. Durch Polykondensation von Mononukleotiden können auf relativ einfache Weise längere Teilstücke von Polynukleotiden hergestellt werden. Die bisherige Arbeitsweise, die in einer Polykondensation von Monoestern zu Diestern bestand, weist Mängel, z.B. ein starkes Abfallen der Ausbeuten an höheren Nukleotiden, auf.

In neuerer Zeit wurde für die schrittweise Synthese von Oligonukleotiden vermehrt mit Phosphorsäuretriestern gearbeitet, da die Reaktionen übersichtlicher verlaufen und die Trennungen sich vereinfachen. Es war das Ziel dieser Arbeit, diese Vorteile für Polykondensationen nutzbar zu machen. Als Modell für diese Studien wurde Thymidin gewählt, da die Einführung von Schutzgruppen im basischen Teil des Nukleosids nicht erforderlich ist und die Abwesenheit der 2'-Hydroxygruppe im Zuckerteil die entsprechenden Komplikationen vermeidet.

5'-O-Monomethoxytritylthymidin wurde mit Pyridinium-β--cyanoäthylphosphat in Pyridin durch Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) kondensiert. Es entstand das Nukleotid 1, welches durch UV.-, IR.- und NMR.-Spektren charakterisiert wurde. Nach zahlreichen Misserfolgen gelang es schliesslich, eine Methode zu erarbeiten, um 1 in grösseren Mengen und rein herzustellen. Das phosphatgeschützte Nukleotid 2 resultierte aus 1 durch Umsatz mit 80-proz. Essigsäure. Es wurde durch UV.-, IR.- und NMR.-Spektren charakterisiert. Die Struktur von 2 wurde durch Abspaltung der β-Cyanoäthylschutzgruppe mit konz. Ammoniak und anschliessender Inkubation mit der 5'-Nukleotidase aus Crotalus adamanteus bestätigt.

Die Thymidinpolynukleotide 5, 6 und 7 wurden aus dem Dinukleotid 4 durch Kondensation mit Thymidin-5'-phosphat in Pyridin mit Mesitylensulfonylchlorid (MS) hergestellt. Die Abspaltung der Schutzgruppe mit 80-proz. Essigsäure ergab die Nukleotide 12 bis 15. Deren Kettenlänge konnte durch Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase aus "Russel's Viper" mit Hilfe des Nukleotid/Nukleosid-Verhältnisses ermittelt werden.

Durch Phosphorylierung der geschützten Nukleotide 4 bis 7 mit Pyridinium-β-cyanoäthylphosphat und Triisopropylbenzolsulfonylchlorid resultierten nach Abspaltung des β-Cyanoäthylrestes die Nukleotide 8 bis 11.

Die Abspaltung der Tritylgruppe aus 8 bis 11 mit 80-proz. Essigsäure ergab die freien Nukleotide 16 bis 19, welche zum Vergleich mit den unten beschriebenen Polykondensationsprodukten benötigt werden. Die erfolgte Phosphorylierung wurde durch Abbau von 16 bis 19 mit Kälberdarmphosphomonoesterase zu 8 bis 11 bewiesen. Die Reinheit und das Vorliegen von 3'→5'-Phosphodiesterbindungen wurde durch Spaltung mit Milzphosphodiesterase bestätigt.

Zur Polykondensation wurde ein Gemisch von 25 Mol-% Nukleotid 1 und 75 Mol-% Nukleotid 2 in Pyridin mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid 12 Tage bei 22° stehengelassen. Die Schutzgruppen liessen sich durch Behandlung mit Essigsäure und Ammoniak entfernen. Das Rohprodukt wurde an DEAE-Cellulose chromatografisch unter Verwendung eines Ammoniumhydrogenkarbonat-Gradienten getrennt. Es konnten lineare Oligonukleotide bis zum Pentanukleotid isoliert und durch direkten chromatografischen Vergleich mit den freien Nukleotiden 16 bis 19 und durch Inkubation mit Monophosphatase identifiziert werden.

Der Grund für die Bildung von nur kurzen Polynukleotidketten liegt in einer durch Pyridin bedingten Kettenabbruch-

reaktion, die das C-Pyridinium-Nukleotid 20 als Hauptprodukt ergab. Es werden die Möglichkeiten erörtert, um diese unerwünschte Reaktion zu unterdrücken.

D. Literaturverzeichnis

[1] Zusammenfassende Artikel in: Progress in Nucleic Acid Research and in Molecular Biolog. Academic Press, New York 1963/64, Bd. I bis III.

[2] S. Nishimura, D. S. Jones, E. Otsuka, H. Hayatsu, T. M. Jacob und H. G. Khorana, J. mol. Biol. 13, 283 (1965).

[3] H. D. Scheraga, Vortrag, Göttingen, September 1965.

[4] F. Cramer, H. Küntzel, J. H. Matthaei, Angew.Chem. 76, 716, 800 (1964); Angew. Chem. intern. Edit. 3, 589 (1964).

[5] S. Ochoa, 2nd FEBS-Meeting, Wien 1965, Referate S. 273.

[6] M. Nierenberg und P. Leder, Science 145, 1399 (1964).

[7] H. G. Khorana, Federat. Proc. 24, 1473 (1965).

[8] R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 819 (1966).

[9] H. Witzel und E. A. Barnard, Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 295 (1962).

[10] W. E. Razzell und H. G. Khorana, J. Biol. Chem. 234, 2105, 2114 (1959).

[11] F. Cramer, Pure Appl. Chem. 18 (1-2), 197-221 (1969).

[12] F. Cramer, Angew. Chem. 78, 186 (1966).

[13] Nachrichten aus Chemie und Technik 18, 245 (1970) .

[14] T. M. Jacob, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 87, 2971 (1965).

[15] S. A. Narang, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 87, 2981 (1965).

[16] F. Cramer, H. J. Baldauf, H. Küntzel, Angew. Chem. 74, 77 (1962).

[17] G. Weimann, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 84, 419 (1962).

[18] H. Kössel, H. Büchi, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 89, 2185 (1967).

[19] J. Hachmann u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 91, 2749 (1969).

[20] A. F. Turner u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 81, 4651 (1959).

[21] G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham u. E. H. Pol, J. Amer. Chem. Soc. 80, 6223 (1958).

[22] H. G. Khorana u. J. P. Vizsolyi, J. Amer. Chem. Soc. 83, 675 (1961).

[23] F. Cramer, Angew. Chem. 73, 49 (1961).

[24] H. G. Khorana, A. F. Turner, J. P. Vizsolyi, J. Amer. Chem. Soc. 83, 686 (1961).

[25] R. K. Ralph, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 83, 2926 (1961).

[26] R. K. Ralph, W. J. Connors, H. Schaller, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1983 (1963).

[27] F. N. Hayes, E. Hansbury, J. Amer. Chem. Soc. 86, 4172 (1964).

[28] G. Weimann, H. Schaller, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3835 (1963).

[29] S. A. Narang, T. M. Jacob, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 89, 2167 (1967).

[30] F. Cramer, W. Frölke, H. Matzura, Angew. Chem. 79, 580 (1967).

[31] U. Séquin, Dissertation Basel 1970.

[32] R. Lohrmann, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 829 (1966).

[33] R. L. Letsinger, U. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. 87, 3526 (1965).

[34] R. L. Letsinger, U. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. 88, 5319 (1966).

[35] T. Shimidzu, R. L. Letsinger, J. Org. Chem. 33, 708 (1968).

[36] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, J. Amer. Chem. Soc. 89, 4801 (1967).

[37] F. Eckstein, I. Rizk, Angew. Chem. 79, 684 (1967).

[38] F. Eckstein, I. Rizk, Angew. Chem. 79, 939 (1967).

[39] F. Eckstein, I. Rizk, Chem. Ber. 102,2362 (1969).

[40] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, J. Amer. Chem. Soc. 91, 3350 (1969).

[41] R. L. Letsinger, K, K. Ogilvie, P. S. Muller, J. Amer. Chem. Soc. 91, 3360 (1969).

[42] K. K. Ogilvie, D. Iwacha, Can. J. Chem. 48, 862 (1970).

[43] G. W. Grams, R. L. Letsinger, J. Org. Chemistry 35, 868 (1970).

[44] T. Neilson, Chem. Comm. 19, 1139 (1969).

[45] H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi, R. K. Ralph, J. Amer. Chem. Soc. 84, 414 (1962).

[46] H. Schaller, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3821 (1963).

[47] H. Schaller, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3828 (1963).

[48] T. M. Jacob, H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 87, 368 (1965).

[49] K. H. Scheit, Biochim. Biophys. Acta 134, 217 (1967).

[50] D. Loev, M. M. Goodman, Chem. Ind. 1967, 2026.

[51] H. Dahn, H. Fuchs, Helv. 45, 261 (1962).

[52] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3821 (1963).

[53] Versuche H. Türler u.Ch. Tamm, Institut für Org. Chemie, Basel.

[54] Versuche P. Pfäffli u.Ch. Tamm, Institut für Org. Chemie, Basel.

[55] Handbook of Enzymology, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1955, Vol. 1, S. 145.

[56] L. R. Melby, D. R. Strobach, J. Org. Chem. 34, 421 (1969).

E. Curriculum vitae

Am 1. Februar 1945 wurde ich, Werner Falk, als Sohn des Dr. Kurt Falk, Chemiker, und seiner Frau Liselotte geb. Heldmann in Ortenberg (Deutschland) geboren. Im selben Jahr siedelten meine Eltern nach Leverkusen (Deutschland) um. Dort besuchte ich von 1951 - 1955 die Volksschule. Im Jahr 1955 trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium der Stadt Leverkusen ein. Im Frühjahr 1962 zogen meine Eltern nach Grenoble (Frankreich) um, während ich von 1962 an die deutsche Abteilung des Institutes auf dem Rosenberg in St. Gallen besuchte und dort im Frühjahr 1964 die Reifeprüfung bestand.

Anschliessend begann ich das Chemiestudium an der Universität Basel im Sommersemester 1964. Im Herbst 1965 legte ich das 1.Vordiplom (Org. Chemie, Anorg. Chemie, Mathematik), im Herbst 1966 das 2.Vordiplom (Physik, Zoologie) ab. Im Frühjahr 1968 erwarb ich das Diplom für Chemie und begann darauf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ch. Tamm mit der Ausarbeitung meiner Doktorarbeit.

Folgenden Herren Professoren und Dozenten verdanke ich meine Ausbildung:

M. Brenner, P. Buchner, H. Balli, H. Erlenmeyer, S. Fallab, C. Grob, F. Gerson, P. Hemmerich, P. Huber, A. v. Hochstetter, E. Hornung, E. Heilbronner, Th. Kaden, H. Kuhn, A. Marxer, E. Miescher, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, P. Schiess, W. Stingelin, H. G. Seiler, R. Schenkel, R. A. Stamm, Ch. Tamm, M. Thürkauf. R. Wizinger, G. Wolf-Heidegger, R. F. Zürcher.